ORSAY
Série A, N°
N° D'ordre :

1270

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

Paul PHAM VAN CHUONG

INTERACTION ENTRE PIGMENTS CANCERIGENES ET ACIDES NUCLEIQUES

ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA LUTEOSKYRINE ET DE LA RUGULOSINE,
DES COMPLEXES BINAIRES (PIGMENT-ION DIVALENT)
ET DES COMPLEXES TERNAIRES (PIGMENT-ION DIVALENT-ACIDE NUCLEIQUE)

Soutenue le 14 mars 1974, devant la Commission d'Examen

MM.	J. TONNELAT	Président
	P. FROMAGEOT	Rapporteur
	R. FREYMANN	
	J.B. LE PECQ	Examinateurs
	G. NEMETHY	

T H E S E

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

Paul PHAM VAN CHUONG

INTERACTION ENTRE PIGMENTS CANCERIGENES ET ACIDES NUCLEIQUES

ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA LUTEOSKYRINE ET DE LA RUGULOSINE, DES COMPLEXES BINAIRES (PIGMENT-ION DIVALENT) ET DES COMPLEXES TERNAIRES (PIGMENT-ION DIVALENT-ACIDE NUCLEIQUE)

Soutenue le 14 mars 1974, devant la Commission d'Examen

MM.	J. TONNELAT	Président
	P. FROMAGEOT	Rapporteur
	R. FREYMANN	
	J.B. LE PECQ	Examinateurs
	G. NEMETHY	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes parents

A ma femme

A mes enfants

A tous ceux qui me sont chers

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542722_0040

Ce travail a été réalisé dans le Service de Biochimie du Département de Biologie au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay. Je remercie Mr. J. COURSAGET, Chef du Département, Mr. P. FROMAGEOT, Chef du Service ainsi que le personnel du groupe administratif du Département, en particulier MM. M. FAINE, et L. CROUX qui m'ont fait bénéficier de conditions exceptionnelles de travail.

Mes remerciements vont tout particulièrement à Mr. P. FROMAGEOT qui m'a accueilli dans son laboratoire et proposé ce sujet de recherches si passionnant. Me renouvelant sans cesse sa confiance, il m'a encouragé et conseillé tout au long de ce travail. Qu'il me soit permis de lui exprimer ici toute ma reconnaissance.

Je suis heureux d'associer J.C. BOUHET à la réalisation de cette thèse. Il a notamment préparé d'importantes quantités de pigments et d'analogues, sans lesquels ce travail n'aurait pu se faire. Par son dévouement sans borne, son efficacité soutenue et sa rigueur scientifique, il m'a aidé et conseillé tout au long de la réalisation de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon amitié.

Mr. J.M. THIERY m'a initié aux techniques de dichroisme circulaire naturel et magnétique. Il m'a fait bénéficier de sa compétence, de son dévouement et de son amitié. Je voudrais lui témoigner ici de mon amicale reconnaissance.

Je prie Mr. J. TONNELAT, Professeur de Biophysique, de trouver ici l'expression de ma reconnaissance respectueuse pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail ainsi que pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de thèse.

Je remercie très vivement Mr. R. FREYMANN, Professeur de Physique Moléculaire Expérimentale, Mr. G. NEMETHY, Professeur associé de Biochimie et Mr. J. LE PECQ, Maître de Conférence en Biochimie, avec qui j'ai eu de fructueuses discussions et qui ont accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier MM. P. DOUZOU, C. HELENE, J. GARNIER, A. GAUDEMER, J.B. LE PECQ et B. REVET qui m'ont accueilli dans leurs laboratoires me permettant de préciser plusieurs points de cette thèse.

Il m'est agréable d'associer à ce travail tous mes collaborateurs, notamment MM. F. TOMA - pour les études de RMN -, R.M. SARTENE - pour les études de RPE -, M. KIRZENBAUM - pour les mesures en IR -, C. SCHNEIDER - pour les analyses en DCM -, G. HUI BON HOA - pour les études de fluorescence -, J.C. PERNOLLET - pour les études en ultracentrifugation - et Mme J. COUPRY -pour les mesures de viscosité - ; ainsi que Melles B. HAAS et M.TRAN MANH SUNG, Mr. T. HAERTLE pour la contribution qu'ils ont apportée à ce travail lors de leurs stages universitaires.

Je remercie Mme D. THIELE et MM. W. GUSCHLBAUER, J.F. CHANTOT, P. DESSEN, P. TOUGARD pour de fructueuses discussions.

Mes remerciements vont également à tous mes collègues de laboratoire, en particulier Melles M.T. SAROCCHI et A. RUET et MM. A. SENTENAC, TRAN DINH SON, S. FERMANDJAN, P. MARCHE, A. ANDRE et M. BLANDIN qui ont su créer une ambiance amicale favorable à la réalisation de ce travail.

Je tiens encore à remercier MMmes C. JOUET, D. PAVOINE, et MM. S. BOUZESKOUL, P. TEYTON et J. BELLAIZE pour leur aide technique efficace.

Ce travail fait l'objet de publications suivantes :

1) P. PHAM VAN CHUONG, J.C. BOUHET, J. THIERY and P. FROMAGEOT
"Conformation of luteoskyrin and rugulosin in solution"
Tetrahedron, 29, 3533 (1973)

2) P. PHAM VAN CHUONG, J.C. BOUHET, C.R.L. SCHNEIDER et P. FROMAGEOT
"Dichroisme Circulaire Magnétique de quelques quinones et hydroxyquinones. Etude de deux analogues cancérigènes lutéoskyrine, rugulosine et de leurs complexes avec les acides nucléiques.
Journal de Chimie Physique (sous presse)

3) J.C. BOUHET, P. PHAM VAN CHUONG and P. FROMAGEOT
"Helical polychelation of luteoskyrin and rugulosin, two carcinogenic natural pigments".
(en préparation)

4) P. PHAM VAN CHUONG, R.M. SARTENE, J.C. BOUHET et P. FROMAGEOT
"EPR studies of Mn(II) complexed to luteoskyrin, with or without Nucleic Acid"
(en préparation)

5) P. PHAM VAN CHUONG, J.C. BOUHET and P. FROMAGEOT
"Interactions between Nucleic Acids and carcinogenic dyes, luteoskyrin and rugulosin"
(en préparation)

6) J.C. BOUHET, P. PHAM VAN CHUONG et P. FROMAGEOT
"Obtention de la lutéoskyrine et de la rugulosine"
(en préparation)

7) J.C. BOUHET, P. PHAM VAN CHUONG et P. FROMAGEOT
"Préparation et étude du 2,2'-diacétylrugulosine"
(en préparation)

8) F. TOMA, P. PHAM VAN CHUONG, J.C. BOUHET et P. FROMAGEOT
"PMR studies of intramolecular hydrogen bonding and structure of luteoskyrin, rugulosin and some polyhydroxy-anthraquinones".
(envoyé à Org. Magn. Res.)

9) F. TOMA, W. HAAR, J.C. BOUHET, P. PHAM VAN CHUONG, H. RÜTERJANS, W. MAURER et P. FROMAGEOT
"Carbon-13 NMR Spectroscopy of hepatotoxic pigments luteoskyrin, rugulosin and their analogs. A structural contribution".

10) M. KIRZENBAUM et J.P. LEICKNAM, P. PHAM VAN CHUONG, J.C. BOUHET et P. FROMAGEOT
"IR studies of luteoskyrin, rugulosin and quinonic analogs".
(en préparation)

11) F. GENET, Y.E. GUERCHAIS, P. PHAM VAN CHUONG, J.C. BOUHET et P. FROMAGEOT
"Cristallographic studies on Luteoskyrin".
FEBS letters, 2, 181 (1969)

RESUME

La lutéoskyrine et la rugulosine sont deux pigments anthraquinoniques synthétisés par des champignons se développant sur le riz, le maïs et d'autres céréales. Ces substances de structures isomériques provoquent chez les animaux supérieurs des tumeurs cancéreuses au niveau du foie. Elles inhibent in vivo et in vitro les principales fonctions biologiques, à savoir la replication, la transcription et la réparation. Corrélativement, la lutéoskyrine et la rugulosine s'associent, en présence d'ions divalents, aux acides nucléiques mono ou bicaténaires en solution. Le but de ce travail est de préciser les modalités d'interaction entre ces substances naturelles et les acides nucléiques.

La première partie est consacrée à l'étude de la conformation de la molécule en solution et à celle des paramètres importants définissant sa structure (moments de transition, états d'ionisation). Une étude de l'effet solvant en spectroscopie d'absorption électronique et de dichroisme circulaire d'une part et une étude des liaisons hydrogènes en RMN du proton et par IR d'autre part ont révélé la conformation de ces pigments en solution. Une étude comparative en dichroisme circulaire magnétique des pigments et de quinones analogues a permis d'attribuer les transitions électroniques. La détermination des pK a montré que dans les conditions physiologiques (milieux aqueux pH 7 à 9) la lutéoskyrine (pK_A = 6,8) et la rugulosine (pK_A = 6,5) étaient partiellement déprotonées (quatre groupes OH).

La deuxième partie est consacrée à l'étude des interactions entre ces pigments et les ions divalents en l'absence de biopolymères. Après une détermination de la stoechiométrie, l'étude cinétique (absorption visible, DC, DOR) et les études par diverses techniques (viscosimétrie, osmométrie thermique différentielle, ultracentrifugation) ont révélé l'existence d'un polychélate (pigment-ion divalent). Une valeur approchée de la distance entre deux ions métalliques voisins du polychélate a été déterminée par RPE de l'ion Mn(II). L'arrangement spatial (angle, distance) des unités monomériques (pigment-ion) a été déduit de l'analyse des spectres optiques (absorption et DC) par la théorie excitonique. Partant de ces données expérimentales, la construction de modèles moléculaires du polychélate a conduit à une structure en hélice droite pour la lutéoskyrine, gauche pour la rugulosine ; le pas de l'hélice étant de 27 Å environ et le nombre d'unités monomériques (pigment-ion) de quatre par tour d'hélice.

La troisième partie de ce travail est consacrée à l'étude de complexes ternaires (pigment-ion divalent-acide nucléique). Les deux types de complexes que forment la lutéoskyrine et la rugulosine avec les acides nucléiques monocaténaires et bicaténaires sont successivement envisagés.

1) Complexe (pigment-ion divalent-acide nucléique bicaténaire) ou complexe II

L'analogie des spectres d'absorption visible, de dichroisme circulaire et de RPE du complexe II et du polychélate d'une part, la dissociation du complexe II en polychélate +ADN d'autre part, permettent de conclure à une adsorption du polychélate sur l'acide nucléique bicaténaire. L'étude du T_M, de la viscosité et de l'influence de la force ionique montre qu'il s'agit d'une adsorption électrostatique partielle (sur un court segment) du polychélate ne modifiant pas sensiblement la structure du biopolymère. Les résultats des études en ultracentrifugation analytique révèlent que le polychélate réunit plusieurs molécules d'ADN, l'ensemble formant un réseau mixte (ADN-Polychélate). La réticulation proviendrait de deux modes de fixation du polychélate à l'ADN :

1°) une adsorption longitudinale d'un court segment de polychélate non-déformé de Ls inséré dans le grand sillon de l'ADN en bout de chaîne du biopolymère.

2°) une adsorption latérale d'un segment de polychélate déformé de Ls ou Rg sur la chaîne polyphosphate par l'intermédiaire des ions Mg^{2+} .

Dans les deux cas, la réticulation résulterait de la liaison des extrêmités libres de polychélates fixés à deux molécules voisines de biopolymère.

2) Complexe (pigment-ion divalent-acide nucléique monocaténaire) ou complexe I

Contrairement à la fixation aspécifique du polychélate sur les biopolymères en double brin (complexe II), la fixation du pigment sous forme complexe I aux acides nucléiques monobrins est spécifique. Il est montré dans ce travail que le complexe I résulte d'une association non covalente entre les macromolécules et les unités (pigment-ion) mettant en jeu deux liaisons. La première liaison relie le groupe phosphate du polymère (résultats RPE) à la molécule de pigment par l'intermédiaire d'un ion divalent (étude de la stoechiométrie), le site de fixation de ce dernier étant probablement situé au niveau de la "cage" (étude des analogues). La deuxième liaison serait une interaction de type London-Van der Waals entre la moitié plane de la molécule de pigment et la base purique des acides nucléiques. Les preuves en faveur de ce deuxième mode de liaison sont les suivantes :

a - la présence des bases puriques est indispensable à la formation du complexe I, les complexes les plus stables obtenus étant Poly(A)-Rg et Poly(I)-Ls.

b - la méthylation en N_1 ou N_6 du poly(A) n'empêche pas la formation du complexe I excluant ces deux sites de liaison éventuels. La méthylation en N_7 du poly(I) déstabilise mais n'inhibe pas la formation du complexe I avec Ls excluant également le site N_7.

c - la constante de stabilité est importante ($k \simeq 2.10^7$). La dénaturation thermique du poly(A) est freinée par formation du complexe I ($T_M \simeq 80°C$) comme dans le cas d'intercalation (des acridines par exemple).

d - l'analogie des spectres du complexe I avec ceux du pigment libre en solution organique (comme le CCl_4) suggère un environnement hydrophobe de la molécule associée au polynucléotide monocaténaire purique.

La constante d'association du complexe I étant supérieure à celle des complexes proflavine-ADN mono ou bicaténaire, une stabilisation mettant en jeu d'autres liaisons que celles mentionnées ci-dessus a été proposée. L'absence de formation de complexe avec le pigment diacétylé et l'examen du modèle moléculaire suggèrent qu'une liaison hydrogène pourrait relier un groupement hydroxy-alcoolique du pigment au groupe N_7 de la base purique voisine. L'augmentation de stabilité du complexe I en présence d'un excès de Mg^{2+} et l'examen du modèle de ce complexe sont en faveur d'une stabilisation par fixation d'un cation supplémentaire entre les groupes CO_5^- du pigment et N_3 des purines voisines par exemple.

En conclusion, la spécificité des associations de ces pigments avec les acides nucléiques permet de mieux comprendre les effets d'inhibition des fonctions biologiques <u>in vitro</u> et <u>in vivo</u>.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE : OBTENTION ET ETUDE DES PIGMENTS ISOLES LUTEOSKYRINE (Ls) et RUGULOSINE (Rg)

Chapitre I : Extraction et purification 6

Chapitre II : Etude conformationnelle en solution 8
1) Nature des chromophores
2) Etude des liaisons hydrogènes

Chapitre III : Etude par dichroisme circulaire magnétique (DCM) des directions de polarisation des moments de transition électronique 19
1) des quinones et hydroxyquinones
2) de Ls et Rg

Chapitre IV : Détermination des pK ; ordre d'acidité des groupements -OH 27

DEUXIEME PARTIE : ETUDE DES COMPLEXES BINAIRES (PIGMENTION DIVALENT)

Chapitre I : Complexation (Ls + Mg) et (Rg + Mg) en milieu aqueux 31
1) Spectres optiques : absorption et DC
2) Zone de pH de stabilité

Chapitre II : Stoéchiométrie des complexes (pigments+Mg) dans l'acétone aqueux 33
1) à l'instant initial
2) à l'instant final (t = 5 jours)

Chapitre III : Etude du polychélate (Ls-ion divalent)(1:1)

1) Mise en évidence du polychélate (Ls-Mg) 38
a- Etude cinétique de la formation du polychélate par spectrophotométrie d'absorption visible, de DC et de DOR
b- Etude en viscosimétrie, osmométrie thermique différentielle et ultracentrifugation
c- Etude de la stabilité du polychélate en présence de solvants dénaturants ou complexants

2) Etude du polychélate (Ls-Mn) par RPE 47
a- Etude des solutions de $MnCl_2$
b- Etude du polychélate
c- Calcul de la distance entre les ions Mn^{2+}

3) Structure du polychélate 50
a- Mode de liaison
b- Sites de fixation des ions divalents
c- Arrangement spatial des monomères
d- Modèle du polychélate

TROISIEME PARTIE : ETUDE DES COMPLEXES TERNAIRES (PIGMENT-ION DIVALENT-ACIDE NUCLEIQUE)

Chapitre I : Structure et sites de fixation des acides nucléiques 57
1) Structure des acides nucléiques mono et bicaténaires (AN_1 et AN_2)
2) Sites potentiels de fixation d'un ligand sur les acides nucléiques

Chapitre II : Complexe II (pigment-ion divalent-AN_2)

1) Rappel des études antérieures 62

2) Analogies spectrales entre le complexe II et le polychélate 63

a - Absorption visible et dichroisme circulaire

b - RPE

3) Etude de la viscosité 66

4) T_M de l'ADN engagé dans le complexe II 67

5) Stabilité du complexe II 68

6) Influence de la force ionique 69

7) Etude en ultracentrifugation analytique 70

8) Modèle du complexe II 72

Chapitre III : Complexe I (pigment-ion divalent-AN_1)

1) Rappel des résultats antérieurs sur le complexe I 75

2) Spectres d'absorption et de DC des complexes (pigment-AN_1) 75

3) Titrage des constituants du complexe I 78

a - Stoechiométrie du Mg^{2+}

b - Dosage des nucléotides puriques (Scatchard)

c - Variation de la concentration du pigment

4) Stabilité du complexe I 86

a - Influence de la force ionique

b - Influence de la température (T_M)

c - Influence du pH

5) Sites de fixation du polymère 90

a - Fixation au groupe phosphate

b - Fixation aux bases puriques

- méthylation du poly(I)
- méthylation du poly(A)
- interaction entre pigment et $poly(I)_4$
- influence du poly(C) sur le complexe Ls-Mg-Poly(I)

6) Sites de fixation du pigment 95
a - Fixation de l'ion divalent
b - Fixation de la partie aromatique

7) Nécessité d'une stabilisation supplémentaire 97

8) Discussion - Modèle du complexe I 98

CONCLUSION 102

REFERENCES 105

ABREVIATIONS

Ls : lutéoskyrine

Rg : rugulosine

DMSO : diméthylsulfoxyde

AN_1 : acide (ribo ou désoxyribo) nucléique monocaténaire

AN_2 : acide (ribo ou désoxyribo) nucléique bicaténaire

ADN ou ADN_2 : acide désoxyribonucléique bicaténaire (natif)

ADN_1 : ADN monocaténaire, dénaturé par chauffage

ARN : acide ribonucléique

Poly(A), Poly(I), Poly(G), Poly(C) et Poly(U) : acides poly-adénylique, inosinique, guanylique, cytidylique et uridylique, respectivement.

Poly(I).Poly(C) : polymère à deux brins, d'acide poly inosique et d'acide poly cytidylique (1:1).

P/D : rapport des concentrations molaires

$$\frac{\text{acide nucléique exprimé en unité Phosphore (P)}}{\text{pigment (Dye)}}$$

DC : dichroisme circulaire

DCM : dichroisme circulaire magnétique

DOR : dispersion optique rotatoire

IR : absorption infra-rouge

RMN : résonance magnétique nucléaire

RPE : résonance paramagnétique électronique

Absorption : absorption électronique (UV - visible)

UV : domaine des longueurs d'onde inférieures à 350 nm

DO, $\Delta\varepsilon$ = densité optique, amplitude du signal de DC, mesurées pour une concentration donnée de produit et pour un trajet optique de 1 cm.

ε ou ε_M = coefficient d'extinction molaire

INTRODUCTION

La lutéoskyrine (Ls) et la rugulosine (Rg) sont deux pigments anthraquinoniques (Fig. 1) synthétisés par des champignons contaminant le riz (d'Egypte, d'Italie, de Californie...) d'autres céréales ainsi que le lait caillé.

Ces pigments attirent aujourd'hui l'attention pour trois raisons :

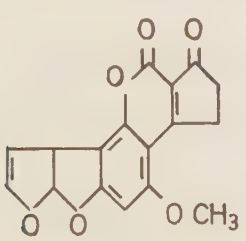
- Dans le cadre de la pollution alimentaire, la lutéoskyrine et la rugulosine sont parmi les contaminants des céréales des carcinogènes potentiels, de la région hépatique (SAITO et al, 1971).

- Du point de vue biochimique, ils inhibent in vivo et in vitro les principales fonctions biologiques : réplication, transcription, réparation.

- Enfin, ces pigments sont les seuls actuellement à présenter une spécificité pour les bases puriques des polynucléotides monocaténaires.

Les graines et farines de céréales stockées dans certaines conditions d'humidité (15 à 20 %) et de température (30-35°C) sont couramment infectées par de nombreux champignons dont les plus fréquents et les plus toxiques appartiennent aux genres Aspergillus et Penicillium (famille des aspergillacées).

- Parmi les six aflatoxines synthétisées par Aspergillus flavus, la plus abondante et la plus toxique notamment pour les mammifères est l'aflatoxine B_1 (ENOMOTO et SAITO 1972, LANCASTER et al 1961, SARGEANT et al 1961). Cette mycotoxine, connue pour son action cancérigène, induit des tumeurs hépatiques ainsi que des adénocarcinomes du rein et du tractus gastro-intestinal (BUTLER et al 1966, DICKENS et al 1966).



Aflatoxine B_1

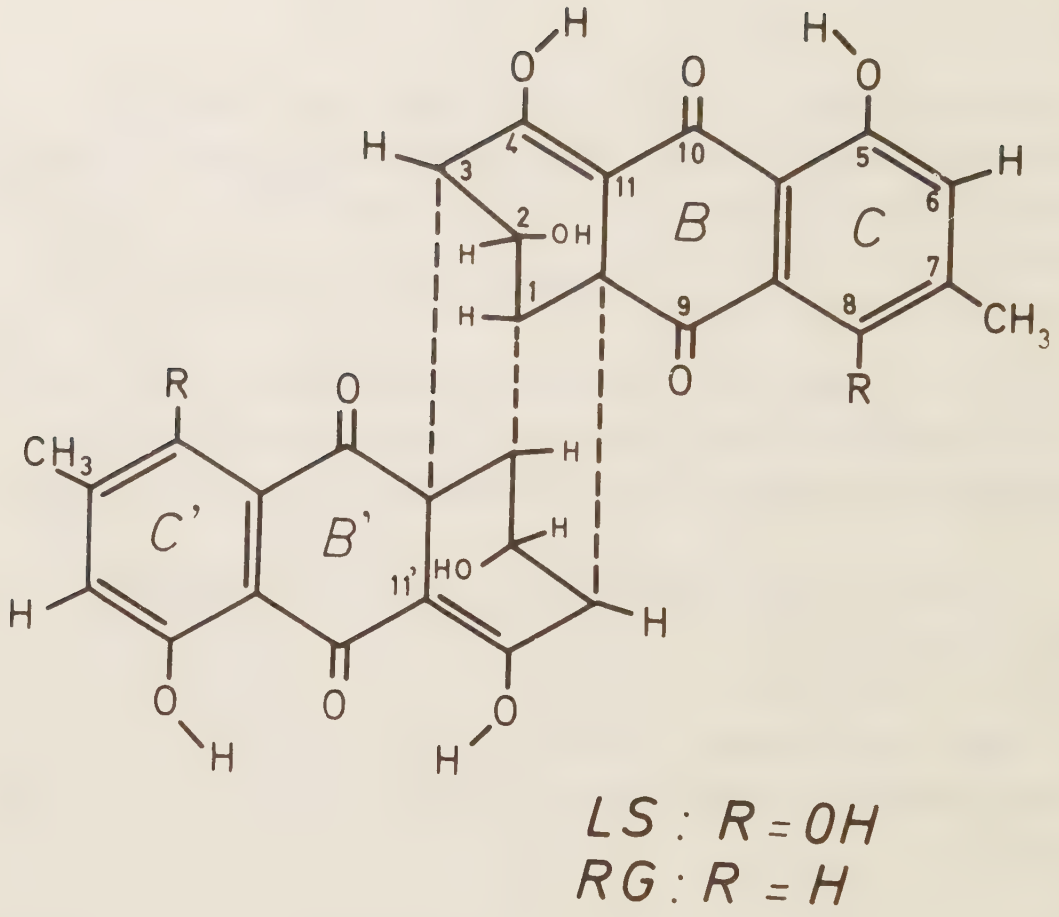


FIGURE 1 - FORMULE CHIMIQUE DES PIGMENTS LUTEOSKYRINE (Ls) ET RUGULOSINE (Rg).
Les traits discontinus représentent les liaisons covalentes C-C entre les deux moitiés de la molécule.

- Les champignons du genre penicillium contaminant les céréales et en particulier le riz moisi, se classent essentiellement en trois groupes (SAITO et al, 1971) :

a) les espèces produisant la citrinine (P. citrinum, P. terreus ...) qui provoque une dégénéresence rénale,

b) les espèces qui synthétisent la citréo-viridine (P. citreo-viride, P. toxicarium ...), toxine responsable de troubles circulatoires et respiratoires, et provoquant une paralysie progressive du système nerveux.

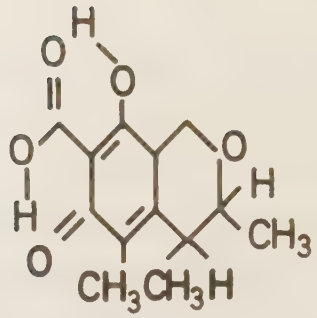
c) les champignons hépatotoxiques (P. Islandicum synthétisant la lutéoskyrine et la cyclochlorotine ; P. rugulosum, P. tardum, P. brunneum ... produisant la rugulosine).

La cyclochlorotine (ou islanditoxine) est un peptide cyclique chloré (Fig. 2) qui affecte directement la fonction glycogénique du foie. Morphologiquement cette substance provoque des vacuolations du foie et des cellules endothéliales périlobulaires. Au contraire, la lutéoskyrine, synthétisée par le même champignon, lèse spécifiquement les cellules de la région centrolobulaire.

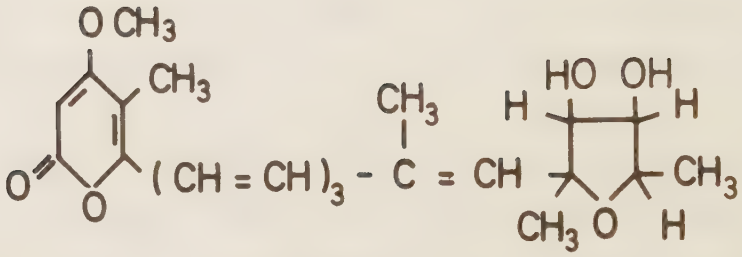
Lutéoskyrine .

La toxicité de la lutéoskyrine a été testée chez la souris par injection et ingestion (I. UENO et al, 1969). Les doses léthales (DL_{50}) sont les suivantes : IV (6,6 mg/lg), IP (40,8), SC (147) et PO (221). Ces différences de toxicité sont dues à la faible solubilité du pigment en milieu aqueux. La toxicité peut être aiguë ou chronique. L'ingestion de doses massives (200 - 500 mg/kg) provoque une intoxication aiguë caractérisée par un gonflement et une destruction irrégulière des cristae mitochondriaux, une dilatation du réticulum endoplasmique cystique ainsi qu'une dégénérescence grasse du foie (SAITO, 1959). La toxicité chronique chez la souris, obtenue par ingestion de doses répétées de 5 à 50 mg/kg pendant un à six mois, est caractérisée par la formation de tumeurs hépatiques (adénomes et carcinomes) avec caryolyse, polyploïdie nucléaire et formation de tissu fibreux (MIYAKE et al 1964, URAGUCHI 1965).

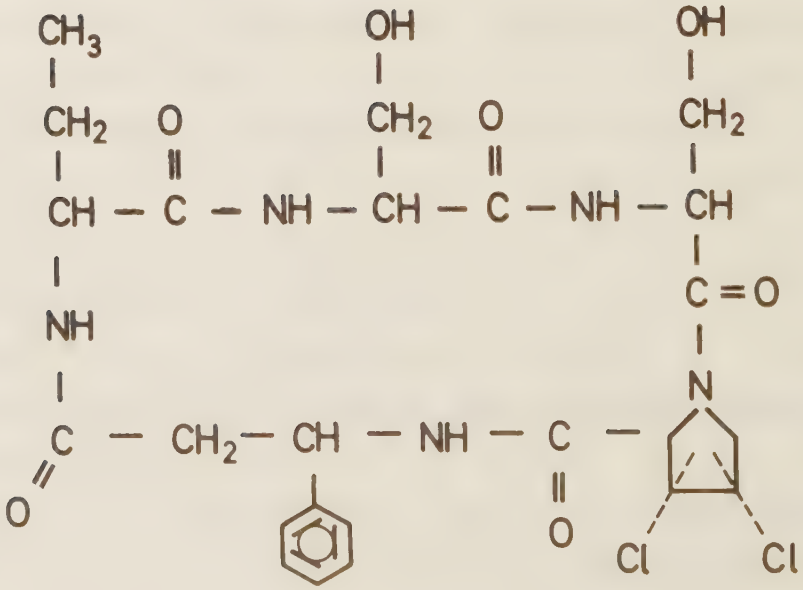
FIGURE 2 -



Citrinine



Citréo - viridine



Islanditoxine

La lutéoskyrine est cytotoxique pour les cellules tumorales (Hela ou Chang) en culture (DL = 1 µg/ml) (UMEDA, 1964). Les modifications cytologiques, semblables à celles observées sur le foie *in vivo*, sont caractérisées par une atrophie cellulaire avec contraction de la membrane du noyau, caryorrhexis ou caryolyse, apparition d'inclusions graisseuses ... Incorporée à la dose de 1 µg/ml à des cultures de tissus hépatiques du rat (UMEDA et SAITO, 1968) ce pigment provoque une nécrose de cellules parenchymatiques.

L'analyse biochimique des cultures de cellules tumorales d'ascites d'Ehrlich (SCHACHTSCHABEL *et al*, 1969) montre que la Ls (1 µg/ml) inhibe davantage la synthèse d'ADN et la replication que la synthèse d'ARN et des protéines. Les cellules "Ls-résistantes" obtenues par adaptation graduelle à la toxine présentent des chromosomes métaphasiques anormalement allongés.

La lutéoskyrine est également toxique (1 à 2 µg/ml) pour les protozoaires (*Tetrahymena pyriformis*). L'addition du pigment à dose plus faible (0,1 µg/ml ou $1{,}7.10^{-7}$M) ralentit la croissance et la multiplication de protozoaires soumis à l'irradiation UV, mettant en évidence le rôle inhibiteur de la lutéoskyrine sur le système réparateur de la cellule. Comparativement à la caféine (dose 10^{-3}M), la Ls est d'ailleurs un antiréparateur plus puissant (MOUTON et FROMAGEOT, 1971).

In vitro, à concentration de l'ordre de 5.10^{-5}M, la lutéoskyrine inhibe la transcription de la RNA polymérase de *E. coli* par fixation sur le complexe de transcription (SENTENAC *et al* 1967, RUET *et al* 1973).

L'activité antibactérienne de Ls est comparée à celle de Rg dans le tableau I.

Rugulosine.

L'activité biologique de ce pigment est comparable mais plus faible que celle de Ls (UENO *et al*, 1971).

La dose léthale (DL_{50}) est de 55 mg/kg en injection intra-péritonéale chez la souris et l'on distingue également deux toxicités, aiguë et chronique, la dernière provoquant des tumeurs hépatiques.

L'effet cytotoxique de la rugulosine pour les cellules de tumeurs d'ascites Ehrlich (c_{Rg} = 4-8.10^{-6}), pour les protozoaires (T. Pyriformis, c_{Rg} = 1-2.10^{-5}M) et certaines bactéries (voir tableau I), est également plus faible que celui de la lutéoskyrine.

Bactérie	Gram	durée de culture (h)	Dose d'inhibition 50% (µg/ml) (+) Rg	(-) Ls
B. subtilis	+	3	0,30	0,13
Staphylococcus aureus	+	4	1,10	0,22
Serratia marcescens	-	2	1,60	0,35
Alcaligenes faecalis	-	6	4,50	1,00

TABLEAU I - Activité antibactérienne (d'après UENO et al, 1971).

La mise en évidence de l'activité biologique de ces deux pigments lésant en particulier le matériel chromatique nucléaire et inhibant les fonctions cellulaires essentielles de replication, transcription et réparation, suggérait d'emblée l'existence d'interactions entre pigments et acides nucléiques in vivo et in vitro.

Les travaux poursuivis in vitro dans notre laboratoire depuis 1965 (UENO et al 1967, OHBA et FROMAGEOT 1967 et 1968) montraient en effet l'existence de deux types de complexes (Ls-Mg-ADN) en solution selon que l'ADN était sous forme monobrin ou sous forme double brin (les complexes étant désignés respectivement par complexe I et II). Les résultats de ces études seront quelque peu détaillés dans la 3ème partie de cette thèse. En résumé, sur la base d'études en absorption UV-visible et d'études par sédimentation, ces auteurs proposaient deux schémas d'interaction distincts : le complexe II serait formé (UENO et al, 1967)

par empilement d'unités monomériques (Ls + Mg) fixées coopérativement aux ions phosphates de l'ADN double brin, schéma qui rappelle celui du complexe coopératif des acridines (BRADLEY et WOLF, 1959). Le complexe I proviendrait par contre (OHBA et FROMAGEOT, 1967 et 1968) d'une interaction spécifique entre l'unité monomérique (Ls Mg) et les acides nucléiques monocaténaires. Ce complexe (stoéchiométrie 1 Ls-1 Mg-2 ADN-P) nécessitant la présence de bases puriques stabiliserait la structure de l'ADN dénaturé.

L'objet de cette thèse est de préciser les modalités d'interaction et de proposer un modèle des deux types d'association. La complexité du phénomène exigeait une étude préalable de la conformation et des propriétés électroniques de la molécule du pigment (1ère partie), suivie d'une étude des complexes avec les ions divalents seuls (2ème partie) avant d'aborder l'étude des complexes avec les acides nucléiques (3ème partie).

1ère PARTIE

OBTENTION ET ETUDE DES PIGMENTS ISOLES (Ls et Rg)

1ère PARTIE - CHAPITRE I

EXTRACTION ET PURIFICATION DE LA LUTEOSKYRINE ET DE LA RUGULOSINE

-:-:-:-:-

1) Lutéoskyrine

Il existe essentiellement deux souches de Penicillium Islandicum synthétisant la lutéoskyrine (parmi une dizaine d'autres pigments) : la souche U provenant du riz de Californie infecté et la souche E contaminant le riz d'Egypte. La souche E, utilisée au laboratoire, don du Dr. TATSUNO (1965) a été repiquée périodiquement sur milieu Czapek Dox solide enrichi en extrait de malt (PLATEL et al, 1968),

Une culture préparative est obtenue par ensemencement de 100 fioles de Roux contenant chacune 250 ml de milieu Czapek Dox liquide placées ensuite à l'obscurité pendant 40 jours à 30°C. La couche brunâtre épaisse de mycelium surnageante est alors prélevée, lavée abondamment à l'eau distillée et séchée (Poids 100 g). La lutéoskyrine est extraite du mycelium alors que le peptide chloré également d'intérêt biologique (voir l'introduction et URAGUCHI et al, 1961) est présent seulement en faible quantité dans le milieu de culture.

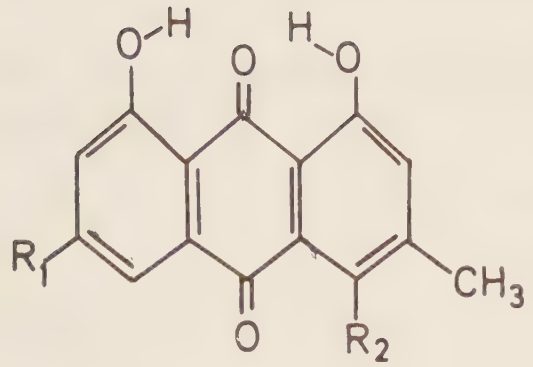
Le processus d'extraction et de purification de la lutéoskyrine utilisé dans notre laboratoire a fait l'objet d'améliorations successives (PHAM VAN 1968, BOUHET et al 1974a) en vue d'obtenir des quantités importantes de lutéoskyrine pure (environ 8 g) avec un rendement final d'extraction optimum (5 % en poids par rapport au mycelium sec). La préparation (BOUHET J.C.) sera décrite succinctement : le mycelium sec broyé finement subit une première extraction lipidique par l'hexane sous reflux. Le pigment est extrait ensuite du mycelium par l'éther puis l'acétone sous reflux. L'extrait brut est alors chromatographié sur

phosphate bicalcique non prétraité, l'élution étant faite par le benzène. L'ordre d'élution est le suivant : Islandicine (Fig.3) + Iridoskyrine, divers pigments (4 ou 5) non identifiés ; catenarine, lutéoskyrine, Rubroskyrine + Skyrine et enfin divers pigments non identifiés (3 ou 4). La lutéoskyrine est pratiquement éluée totalement après 11 jours de chromatographie continue. Les fractions sont analysées par chromatographie sur gel de silice prétraité à l'acide oxalique (0,05 M), le solvant étant la phase supérieure du mélange Acetone Hexane eau (240-120-40). Les fractions riches en lutéoskyrine sont collectées puis concentrées à sec. La lutéoskyrine est filtrée sur charbon dans l'acétone puis recristallisée dans le mélange Acetone Hexane (2-1). La pureté des cristaux (> 99 %) est contrôlée par chromatographie sur couche mince et par analyses spectroscopique (UV, IR, RMN) et spectrométrique (masse).

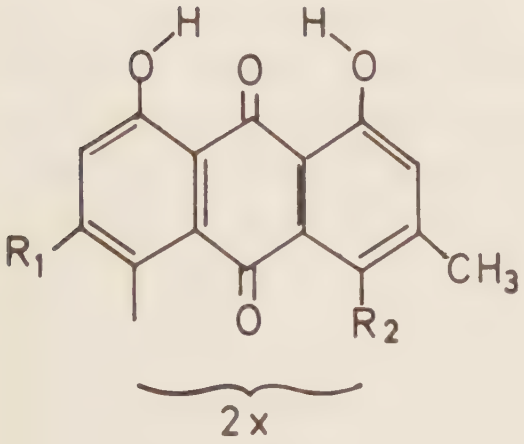
2) Rugulosine

La rugulosine extraite du Penicillium rugulosum a été purifiée par J.C. BOUHET selon le processus résumé suivant :
Les conditions de cultures sont identiques à celles utilisées pour le Penicillium Islandicum mais la croissance optimum du champignon est obtenue sur milieu solide contenant 15 g/l d'Agar. Dans ces conditions les pigments complexés sont d'abord extraits (pour 80%) du mycelium sec -préalablement acidifié (HCl 2 N) - par l'éther puis l'acétone. Le reste des pigments est obtenu comme précédemment par extraction acétonique du mycelium sous reflux. L'extrait brut (7,5 % du mycelium sec) analysé par chromatographie sur couche mince comme décrit ci-dessus pour la lutéoskyrine, contient essentiellement 2 pigments : la rugulosine et la skyrine (environ 50-50). L'extrait brut est chromatographié sur colonne de gel Sephadex LH 20 dans l'acétone. La rugulosine (90 % de pureté), pratiquement éluée en totalité après 10 heures d'élution, est recristallisée plusieurs fois dans le méthanol ou l'acétone jusqu'à obtention de microcristaux jaune pâles (quantité = 4 g). Le rendement final d'extraction de la rugulosine est voisin de 4% en poids du mycelium sec. La pureté des cristaux (> 99%) est testée par analyse chromatographique sur couche mince par spectroscopie IR, RMN et spectrométrie de masse.

FIGURE 3 -

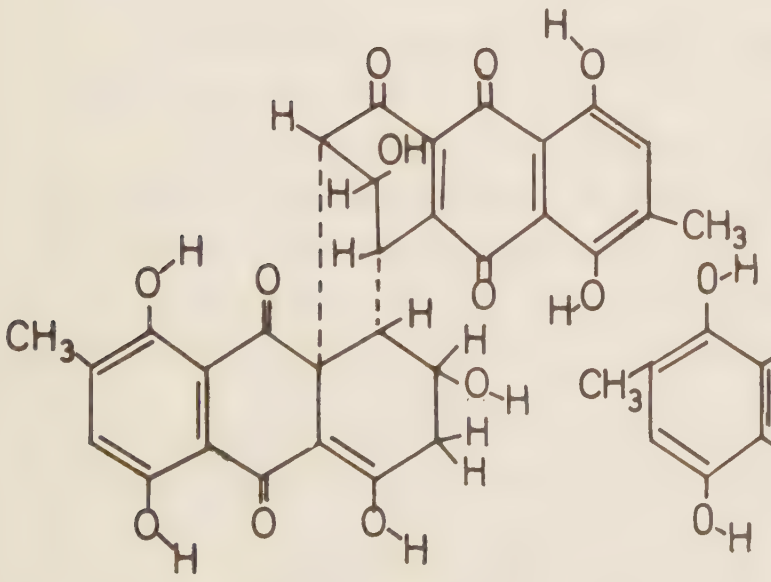


$R_1 = R_2 = H$ chrysophanol
$R_1 = R_2 = OH$ caténarine
$R_1 = H$ $R_2 = OH$ islandicine
$R_1 = OH$ $R_2 = H$ émodine

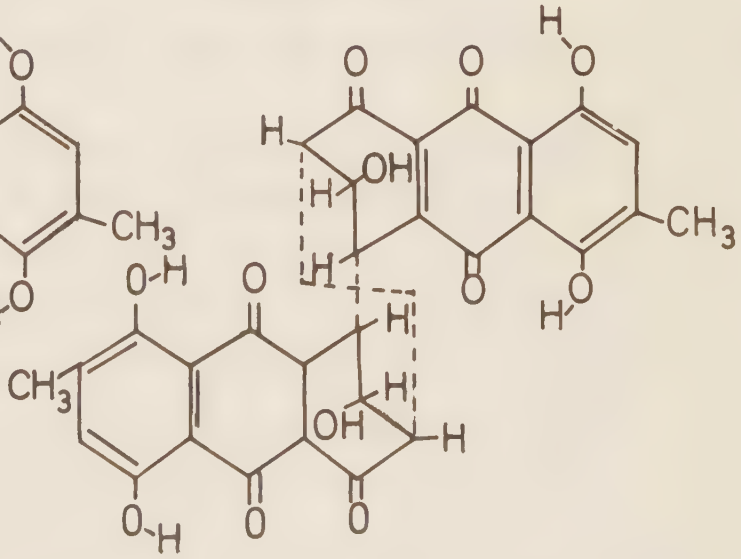


2x

$R_1 = R_2 = H$ dianhydrorugulosine
$R_1 = R_2 = OH$ dicaténarine
$R_1 = H$ $R_2 = OH$ iridoskyrine
$R_1 = OH$ $R_2 = H$ skyrine



Rubroskyrine



Lumi lutéoskyrine

1ère PARTIE - CHAPITRE II

ETUDE CONFORMATIONNELLE DE LA LUTEOSKYRINE ET DE LA RUGULOSINE EN SOLUTION

-:-:-:-:-:-:-

INTRODUCTION

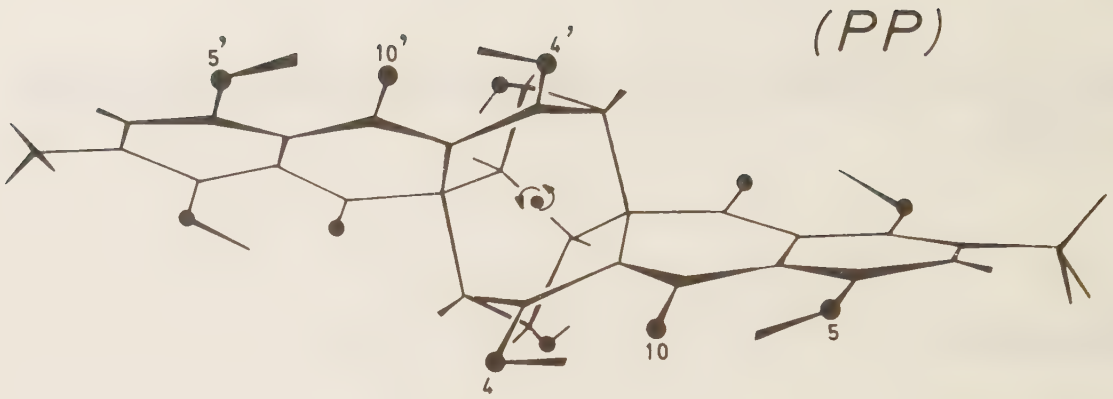
La lutéoskyrine et la rugulosine ont fait l'objet de nombreuses études structurales, chimiques et physico-chimiques (HOWARD et al 1954, BREEN et al 1955, SHIBATA et al 1956 a et b, SHIBATA et al 1968). Récemment l'étude cristallographique (KOBAYASHI et al, 1970) du dibromodéhydrotétrahydrorugulosine (BHRg) a permis de déduire la structure de la rugulosine et de la lutéoskyrine (Fig. 1). L'extrapolation au cas de la lutéoskyrine et de la rugulosine sur ces bases cristallographiques appelle trois remarques :

1 - Les formes cristallines de Ls et de BHRg sont différentes (GENET et al 1969, KOBAYASHI et al 1970).

2 - Les structures à définir sont plus spécialement celles des molécules en solution.

3 - La construction de modèles moléculaire (DREIDING, 1959) montre que la molécule de BHRg est rendue rigide par l'existence d'une liaison entre les carbones 11 et 11' qui n'est pas présente dans Ls ou Rg . La molécule BHRg présente donc un "plan moyen" des moindres carrés pour les deux moitiés de la molécule (KOBAYASHI et al, 1970), par contre la Ls et la Rg plus flexibles, pourraient adopter d'autres conformations dont les deux formes limites sont représentées dans la figure 4 :

- la première (AA) (angulaire-angulaire) est similaire à celle du cristal de BHRg . Dans cette conformation, les oxygènes en positions 4 et 4' sont très écartés d'un "plan moyen" passant approximativement par les cycles B, C et B', C' . Les droites



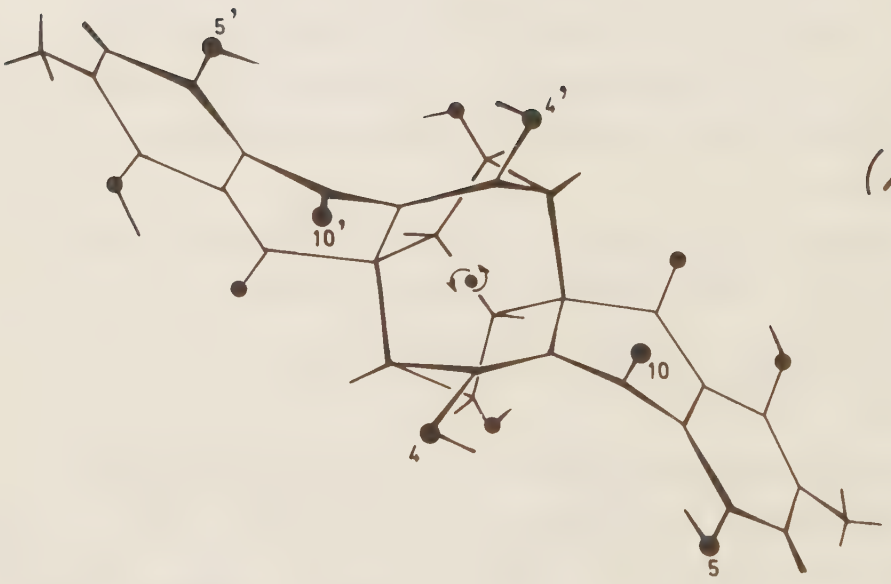


FIGURE 4 - CONFORMATIONS LIMITES DE Ls.

(·) représente un axe de symétrie C_2.

joignant les oxygènes $O_{10} - O_4$ et $O_{10} - O_5$ forment un angle d'environ 150° dans chaque moitié de la molécule. Les carbonyles 9 et 10, 9' et 10' étant pointés en dehors des plans définis par les cycles aromatiques C et C' , les cycles B et B' prennent une conformation "bateau". A la limite, on pourrait considérer chaque moitié comme un chromophore acétophénonique substitué. Une telle structure présenterait par ailleurs des liaisons hydrogènes plutôt intermoléculaires qu'intramoléculaires.

- Dans la seconde conformation (PP) (plan-plan), les deux moitiés sont les plus planes possibles. Les oxygènes O_4 , O_{10} et O_5 sont alors colinéaires dans un plan passant par le cycle aromatique (C) et les carbones C_3, C_4 , C_{10}, C_{11} . La situation est analogue pour les oxygènes $O_{4'}$, $O_{10'}$ et $O_{5'}$. Dans ce cas les molécules peuvent être considérées comme des "dimères" d'anthraquinones substituées.Les chromophores sont alors similaires à des poly-α-hydroxyanthraquinones où les liaisons intramoléculaires sont très fortes.

En conclusion des remarques précédentes il paraît indispensable de préciser la conformation prédominante des pigments Ls et Rg en solution, conformation qui permettra, par ailleurs, d'expliquer certains types d'associations entre les pigments et les acides nucléiques.

Dans ce but, nous avons étudié la nature des chromophores de ces pigments ainsi que celle de leurs liaisons hydrogènes. La distinction entre chromophore acétophénone et hydroxyanthraquinone a été envisagée par comparaison de spectres électroniques et par détermination, par effet de solvants, de la nature ($n-\pi^*$ ou $\pi-\pi^*$) de la transition d'énergie la plus basse. Ces résultats ont permis de proposer pour Ls et Rg une conformation plane dans la plupart des solvants étudiés. Le traitement des effets de solvants selon les relations de McRAE et KOSOWER a conduit à l'hypothèse de liaisons hydrogènes intramoléculaires fortes, liaisons dont l'existence a été également confirmée par des études en IR et RMN.

MATERIELS ET METHODES

Les solvants utilisés sont de qualité spectroscopique (Merck). Les solvants basiques sont en outre purifiés juste avant l'emploi : la pyridine est distillée sur P_2O_5 puis sur CaH_2 ; le dioxanne est distillé sous reflux sur NaOH en pastille, puis sur sodium (KRAUS et VINGEE , 1934). La formamide, le DMF, l'éther éthylique et le chloroforme sont purifiés selon les méthodes classiques (RIDDICK et BUNGER, 1970). Les spectres dans les solvants protophiles non purifiés (même pour les solvants de grade spectroscopique), ne sont pas reproductibles. Les solvants hygroscopiques comme le DMSO sont manipulés en atmosphère d'azote (boîte à gants). Les solutions alcooliques acides sont obtenues en additionnant de micro quantités de HCl ou $HClO_4$ concentré , directement dans la cuve de mesure pour avoir des solutions finales de 0,1 N environ.

Les spectres sont enregistrés à diverses concentrations en pigments (domaine de la loi de Beer-Lambert), utilisant des longueurs appropriées (0,1 à 2 cm) de cuve de mesure. Les erreurs relatives au coefficient d'extinction molaire et à la longueur d'onde du maximum d'absorption sont inférieures à 5% et 0,5 nm respectivement. Les spectres d'absorption sont enregistrés à l'aide du Cary 14 équipé du système digital Datex ; ceux de DC, à l'aide d'un dichrographe II (Jouan) relié à un calculateur (PDP 12) pour l'acquisition des données. Les divers traitements des données sont réalisés à l'aide des calculateurs PDP 12 et CDC 6600. Les spectres IR sont enregistrés à l'aide d'un appareil PE-225 et ceux de RMN, à l'aide des appareils Varian A 60 ou PE-R12.

RESULTATS ET DISCUSSION

1) Nature des chromophores de Ls et Rg

Les spectres d'absorption UV-visible de l'acétophénone, de l'anthraquinone et de leurs dérivés hydroxylés sont connus (MORTON et EARLAM 1941, SPRUIT 1949, SCOTT 1964). Les principales différences entre ces spectres concernent la nature ($n-\pi^*$ ou $\pi-\pi^*$) et la position de la bande d'absorption d'énergie la plus faible. Cette bande est située vers 340 nm environ pour la transition $n-\pi^*$ des dérivés de l'acétophénone et vers 500 nm pour la transition $\pi-\pi^*$ des polyhydroxynaphto-et anthraquinones. La position de la bande de plus faible énergie, centrée vers 390 nm dans le cas de Rg et vers 440 nm dans le cas de Ls , est intermédiaire par rapport à celles des deux séries de composés mentionnés. Cette situation pourrait résulter soit du recouvrement des orbitales n et π dans la conformation angulaire (AA) , soit du manque de planéité des noyaux B et B' dans la conformation (PP) .

L'intensité, relativement élevée, de la bande d'absorption considérée de Ls et Rg ($\varepsilon \sim 6500$ par groupement carbonyle) serait en faveur de la seconde hypothèse ; cependant des valeurs ε_m élevées des bandes ($n-\pi^*$) ont été trouvées pour des systèmes non coplanaires (MASON 1961, LABHART et WAGNIERE 1959) .

Une simple comparaison de spectres électroniques des analogues n'étant pas concluante, nous avons été amenés à faire une étude plus approfondie, par effet de solvants, de la nature ($n-\pi$ ou $\pi-\pi^*$) de la transition d'énergie électronique la plus basse. L'effet solvant doit permettre en principe de distinguer entre les transitions $n-\pi^*$ et $\pi-\pi^*$ ainsi qu'il ressort de nombreuses études de la littérature (BURAVOY 1941, KASHA 1950, McCONNEL 1952, BREALEY et KASHA 1955).

Les spectres d'absorption et de dichroisme circulaire de la lutéoskyrine et de la rugulosine en solution dans 45 solvants ont été enregistrés. Les figures 5 (Ls) et 6 (Rg) repré-

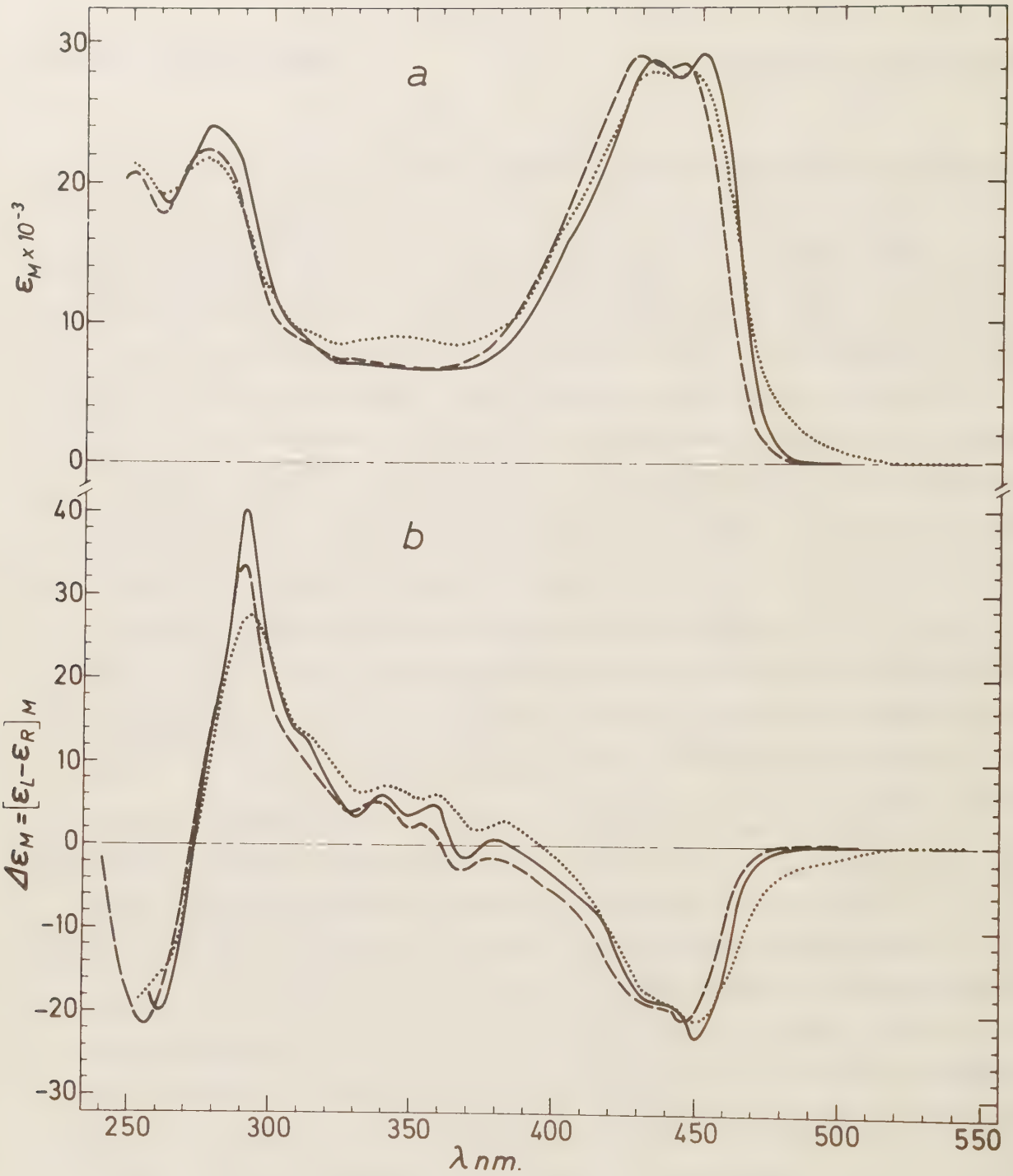


FIGURE 5 - SPECTRES D'ABSORPTION ELECTRONIQUE (a) ET DE DICHROISME CIRCULAIRE (b),
de la lutéoskyrine en solution dans :

——— le tétrachlorure de carbone
----- l'acide acétique
····· le diméthylsulfoxyde (DMSO)

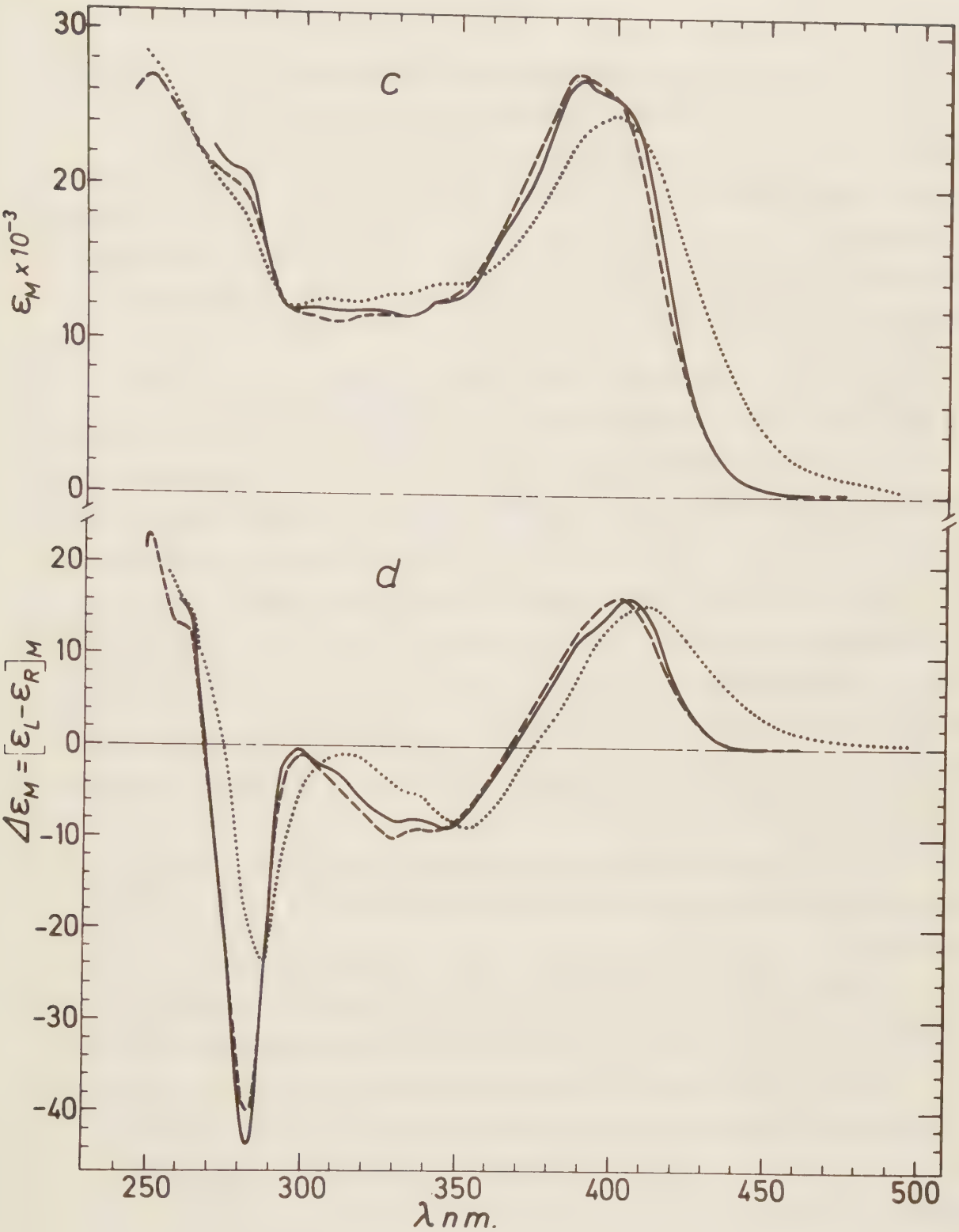


FIGURE 6 - SPECTRES D'ABSORPTION (c) ET DE DC (d) DE LA RUGULOSINE.
(Légendes : voir Fig. 5).

sentent les spectres caractéristiques d'absorption et de DC des solutions de pigments dans l'acide acétique, le tétrachlorure de carbone (CCl_4) et le diméthylsulfoxyde (solvants de type protique, aprotique et protophile (BATES, 1954) . [Les valeurs des longueurs d'onde des maxima (λ_M) et celles des coefficients d'extinction molaire (ε_M) et différentielle ($\Delta\varepsilon_M$) des solutions de pigments dans les solvants étudiés sont disponibles au laboratoire] .
Les valeurs des fréquences de la bande d'absorption d'énergie la plus faible sont représentées dans le tableau 2 .

Nous observons que la position de ce maximum d'absorption est déplacé vers les courtes longueurs d'onde, par rapport au CCl_4 , dans l'ordre CCl_4 < $CHCl_3$ < n pentanol < n butanol < n propanol < éthanol < méthanol comme dans le cas des transitions $\underline{n-\pi^*}$. Cependant, ces déplacements hypsochromes sont faibles comparativement à ceux de la littérature (JAFFE et ORCHIN, 1966). De plus, les spectres de Ls et Rg en solution dans les solvants aprotiques, tels que l'acétone, l'acétonitrile ou le nitrométhane, présentent par rapport aux spectres de référence dans le CCl_4 des déplacements hypsochromes inattendus dans le cas des transitions $\underline{n-\pi^*}$.

Le problème, dans le cas présent, est donc complexe et ne peut se résoudre par ces simples observations mais nécessite une étude plus détaillée.

Pour mettre en évidence la nature $\underline{\pi-\pi^*}$ de la bande d'absorption étudiée on peut faire une analyse de l'effet de solvants selon McRAE (McRAE, 1956) . Cet auteur compare la différence de fréquences obtenue expérimentalement entre l'absorption électronique d'une molécule en solution et à l'état gazeux ($\Delta\bar{\nu}_e = \bar{\nu}_s - \bar{\nu}_o$) , à la différence de fréquences calculées d'après la relation

$$\Delta\bar{\nu}_c = \bar{\nu}_c - \bar{\nu}_o = (AL_o + B)X + CY + EY^2$$

où A, B, C, E sont des paramètres caractéristiques du soluté,

L_o est la longueur d'onde moyenne du solvant

$$X = \frac{n_D^2 - 1}{2n_D^2 + 1}$$ (n_D = indice de réfraction du solvant)

$$Y = \frac{D - 1}{D + 2} - \frac{n_D^2 - 1}{n_D^2 + 2}$$ (D = constante diélectrique du solvant)

La condition $\Delta\bar{\nu}_e = \Delta\bar{\nu}_c$ n'est vérifiée que si les principales forces d'interaction sont de nature dispersive ou électrostatique et si les liaisons hydrogène soluté-solvant sont négligeables (McRAE 1956, BAYLISS et McRAE 1954, SCHUBERT et CRAVEN 1960).

Les résultats (Fig. 7) montrent que la Ls en solution dans les solvants apolaires ou faiblement protiques (alcools) suit bien la relation de McRAE : les valeurs $\Delta\bar{\nu}$ pour les solutions 1 à 30 se placent sur la droite des moindres carrés obtenue dans le cas des solvants non polaires. L'ordre croissant de déplacement hypsochrome observé avec les alcools, suit l'ordre décroissant des indices de réfraction comme dans le cas de la transition $(\underline{\pi-\pi^*})_{260nm}$ du benzène. Ces résultats permettent d'éliminer sans ambiguité l'hypothèse d'une transition $\underline{n-\pi^*}$ de Ls .

D'autres arguments, tels que l'augmentation de l'intensité de la bande d'absorption considérée par acidification des solutions alcooliques de Ls d'une part, et la faible variation de la force rotationnelle de la bande DC correspondante par changement de solvants d'autre part, confirment l'hypothèse de la nature $(\underline{\pi-\pi^*})$ de cette transition.

En conclusion, le chromophore de Ls (et de Rg) prédominant en solution dans les solvants n°1 à 30, peut être considéré comme un analogue quinonique. Dans cette éventualité, on doit s'attendre à une stabilisation du chromophore par liaisons hydrogènes intramoléculaires fortes.

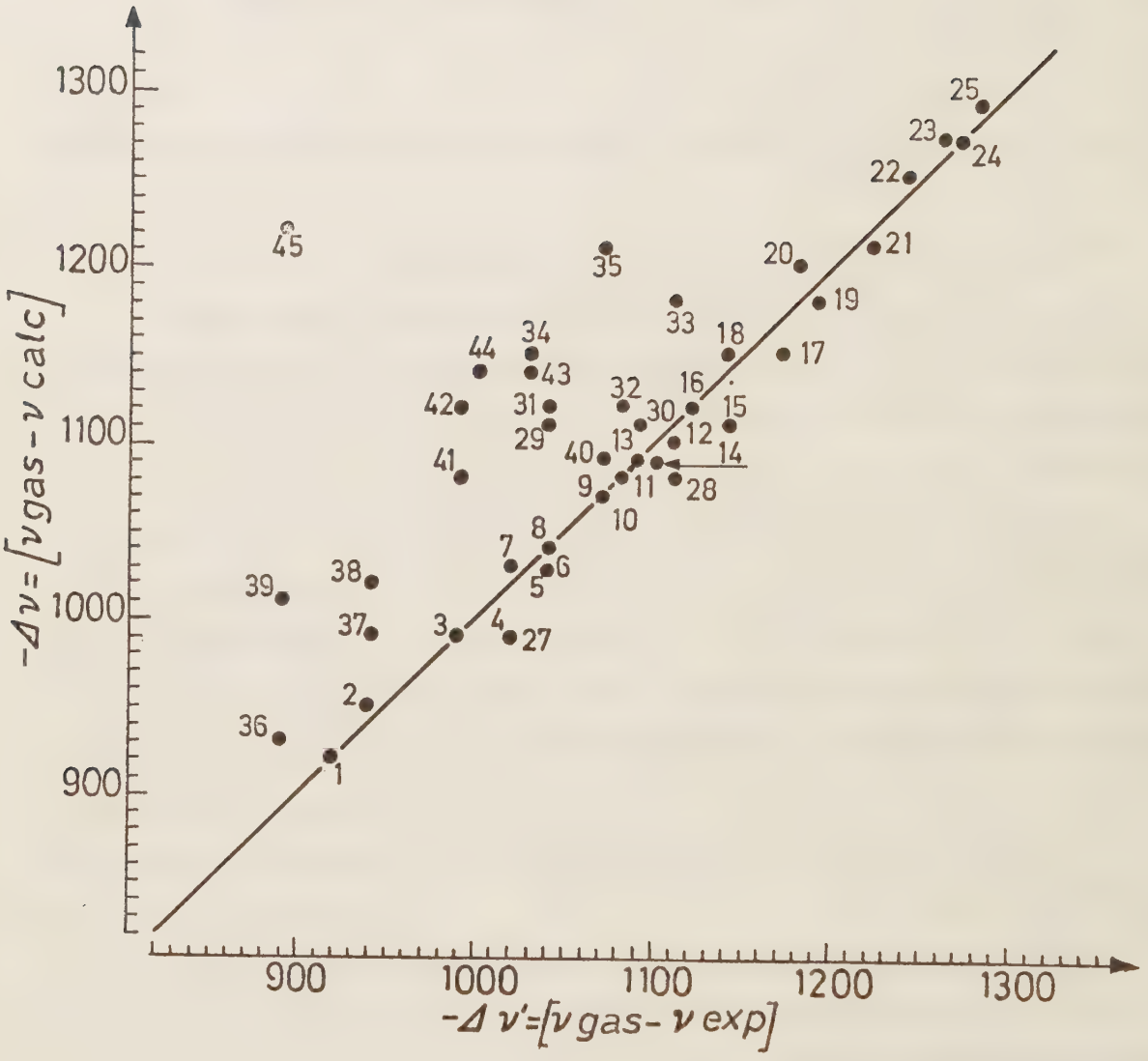


FIGURE 7 - COURBE DE McRAE.

Différence de fréquences calculée ν_{calc} différence de fréquences expérimentales.

Les numéros correspondent aux solvants du tableau 2.

TABLEAU 2 - Valeurs expérimentales et calculées de divers paramètres (voir texte) des solutions de Ls et des solvants correspondants.

N°	SOLVANT	n_D	D	$\bar{\nu}exp(cm^{-1})$	X	Y	$\bar{\nu}exp-\bar{\nu}cal$ (cm^{-1})
1	Méthanol	1.3256	32,6	22 500	0,168	0,710	0
2	Acétonitrile	1.3440	36,3	22 580	0,174	0,709	10
3	Acétone	1.3585	20,7	22 430	0,180	0,647	0
4	Ethanol	1.3612	24,3	22 400	0,181	0,664	-30
5	Isopropanol	1.3776	18,3	22 380	0,187	0,621	-10
6	1:2-diméthoxyéthane	1.3792	6,6	22 380	0,187	0,419	-10
7	Nitrométhane	1.3822	38,5	22 400	0,188	0,693	10
8	n Propanol	1.3850	17,7	22 380	0,189	0,613	0
9	iso Butanol	1.3952	17,2	22 350	0,193	0,603	0
10	n Butanol	1.3993	17,8	22 350	0,194	0,606	0
11	Alcool t-amylique	1.4045	5,7	22 340	0,197	0,365	0
12	iso Pentanol	1.4061	15,6	22 310	0,197	0,584	-20
13	n Pentanol	1.4072	15,0	22 330	0,197	0,577	0
14	Tetrahydrofurane	1.4075	7,7	22 320	0,197	0,445	-10
15	Dichlorométhane	1.4238	9,1	22 280	0,203	0,474	-30
16	2-Octanol	1.4255	7,7	22 300	0,203	0,434	0
17	Chloroforme	1.4440	4,8	22 250	0,200	0,293	-20
18	1,2-Dichloroéthane	1.4442	10,6	22 280	0,209	0,496	10
19	Tétrachlorure de carbone	1.4589	2,2	22 230	0,214	0,012	-10
20	Cyclohexanol	1.4642	15,0	22 240	0,216	0,547	20
21	Trichloroéthylène	1.4772	3,4	22 220	0,220	0,161	-10
22	Benzène	1.4980	2,2	22 180	0,226	0,007	10
23	Tetrachloroéthylène	1.5054	2,4	22 150	0,228	0,021	-10
24	Pyridine	1.5120	12,3	22 150	0,230	0,490	0
25	Chlorobenzène	1.5232	5,6	22 140	0,234	0,299	10
26	Sulfure de carbone	1.6271	2,6	21 950	0,261	0,006	-30
27	Ether éthylique	1.3524	4,3	22 400	0,177	0,307	-30
28	Triéthylamine	1.4003	2,4	22 310	0,195	0,078	-30
29	p-Dioxanne	1.4240	2,2	22 380	0,203	0,030	70
30	Tri-n-butyl-phosphate	1.4240	7,9	22 330	0,203	0,441	20
31	Diméthylformamide	1.4302	37,6	22 380	0,205	0,691	80
32	N-Ethylacétamide	1.4331	175,0	22 350	0,206	0,723	50
33	Hexaméthylphosphorique triamide	1.4582	30,0	22 310	0,214	0,633	70
34	Formamide	1.4470	109,0	22 390	0,210	0,705	120
35	Diméthylsulfoxide	1.4790	47,0	22 350	0,220	0,655	140
36	Méthanol acide	1.3295	32,6	22 530	0,169	0,709	40
37	Ethanol acide	1.3629	24,3	22 480	0,181	0,663	50
38	Acide acétique	1.3700	6,2	22 450	0,184	0,407	80
39	Acide formique	1.3714	57,9	22 530	0,184	0,722	120
40	Isopentanol acide	1.4062	15,2	22 350	0,197	0,579	20
41	Ethylèneglycol monométhyl éther	1.4020	16,0	22 430	0,195	0,589	90
42	Ethylène glycol	1.4290	37,7	22 430	0,204	0,666	130
43	Propylène glycol	1.4324	30,0	22 390	0,206	0,645	110
44	Propylène acide glycol	1.4324	30,0	22 420	0,206	0,645	140
45	Glycérol	1.4730	41,1	22 530	0,219	0,649	330

2) Etude des liaisons hydrogènes de Ls et Rg .

La conformation (PP) doit renforcer les liaisons hydrogènes intramoléculaires, la conformation (AA) doit au contraire favoriser les liaisons hydrogènes entre soluté et solvant.

Les propriétés des liaisons hydrogènes dans Ls et Rg ont été étudiées par absorption électronique et infrarouge, et par résonance magnétique protonique.

En absorption UV-visible, la présence de liaison hydrogène entre soluté et solvant protique se manifeste, dans le cas de la transition $n-\pi^*$, par un écart à la droite des moindres carrés du traitement de McRAE (BAYLISS et McRAE, 1954). De tels écarts ont aussi été mis en évidence dans le cas de transitions $\pi-\pi^*$ de molécules présentant des liaisons hydrogène soluté-solvant protophile, comme les halogénophénols (SCHUBERT et CRAVEN, 1960) ou la 2-hydroxyanthraquinone (YOSHIDA et TAKABAYASHI, 1968).

Dans le cas de Ls , les valeurs trouvées pour des solutions dans l'acétonitrile, l'acétone, le nitrométhane ou l'éther éthylique qui sont de bons accepteurs de protons (REICHARDT, 1971) s'alignent bien sur la droite des moindres carrés obtenue pour les solvants non polaires à l'aide de la relation de McRAE. Ce comportement suggère que tous les groupements -OH de la lutéoskyrine sont liés par liaisons H aux groupements carbonyles vicinaux de la molécule de pigment. De plus, la faible valeur du paramètre C ($C_{Ls} = 15$) comparée aux résultats obtenus dans le cas des 1-hydroxyanthraquinones (YOSHIDA et TAKABAYASHI, 1968), et calculée d'après la relation de McRAE (McRAE, 1956), confirme l'existence des liaisons hydrogènes intramoléculaires fortes.

Cependant, les liaisons des groupes -OH avec les solvants fortement ionisants et protogéniques (acide formique), protophile (DMSO) ou amphiprotiques (formamide, glycols) (REICHARDT, 1971) seraient encore plus fortes que les liaisons hydrogènes internes de la molécule. Dans ce cas, la rupture de

liaisons H intramoléculaires conduirait à un déplacement hypsochrome tandis que la formation de nouvelles liaisons H avec le solvant entraînerait un déplacement bathochrome, l'effet observé étant la résultante de ces deux effets opposés. Ceci expliquerait les écarts à la relation de McRAE de la Ls en solution dans les solvants 31 à 45 (tableau 2).

On arrive à la même conclusion par l'analyse des résultats de l'effet de solvants selon la relation de KOSOWER qui tient compte des liaisons H soluté-solvant (KOSOWER, 1958a). Cet auteur propose une relation empirique $Z = k \cdot E_T$. Il appelle Z l'énergie de transition correspondant à la bande d'absorption de plus faible énergie du spectre d'un composé de référence (iodure de 1-éthyl 4-carbométhoxypyridinium) dissous dans un solvant donné ; et E_T, l'énergie de transition de la bande d'absorption correspondante du composé étudié (Ls dans notre cas) dissous dans le même solvant. Toutes les forces d'interaction, y compris les liaisons H soluté-solvant, étant similaires pour le composé de référence et celui étudié, Z doit être une fonction linéaire de E_T lorsqu'on change de solvant (KOSOWER, 1958).

Les résultats de ce traitement pour Ls sont représentés dans la figure 8 . Nous avons tracé une droite passant par les points représentatifs des solvants n°1, 4, 5, 8, 10 et 24, points qui ont déjà vérifié la relation de McRAE. L'écart à la droite de KOSOWER pour les autres solvants suggère l'interférence d'autres effets comme l'affaiblissement partiel ou total des liaisons H intramoléculaires par exemple.

Nous devons maintenant tenter de localiser les liaisons H internes. L'examen de la molécule montre <u>a priori</u> deux possibilités :

- Les liaisons H s'établissent entre les deux moitiés, c'est à dire entre les carbonyles CO_{10} , $CO_{10'}$ et les hydroxyles $OH_{4'}$, OH_4 respectivement, laissant libres les OH_5 et 5'.

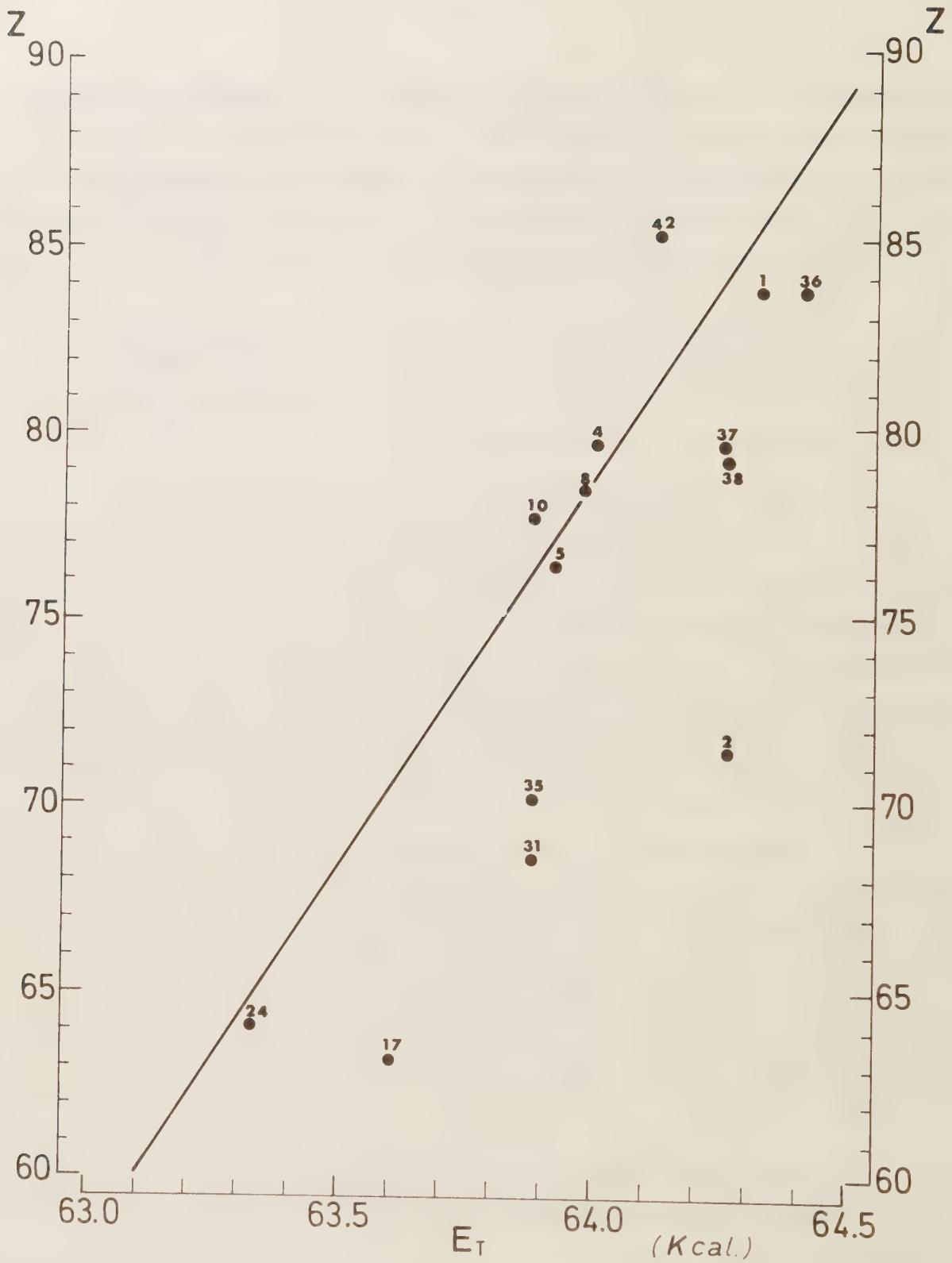


FIGURE 8 - TRAITEMENT DE KOSOWER.
Energie de transition E_T versus Z
numéros des solvants : voir Tableau 2.

Cet arrangement stabiliserait la conformation (AA).

- Les liaisons H ont lieu, dans chaque moitié, entre les groupements carbonyles et hydroxyles vicinaux, stabilisant ainsi la conformation (PP) .

Trois séries d'arguments permettraient de retenir l'une de ces deux hypothèses :

1) Les distances entre les oxygènes O_{10} ... H - O_4, et O_{10},... H - O_4 dans la conformation (AA) sont de l'ordre de 3,2 Å alors qu'elles sont de 2,4 Å environ pour O_{10}...H - O_4 et O_{10}...H - O_5. Ce deuxième type de liaison H est donc plus fort (DARLOW, 1959). En outre, la "cage" centrale rigide de Ls et Rg ne permet pas de réduire la distance existant entre les deux moitiés de la molécule.

2) Si les hydroxyles en 5 et 5' étaient libres, on aurait observé des changements importants des spectres d'absorption du pigment en changeant de solvants; tel est le cas des phénols (BABA et SUZUKI, 1961) ou de la 2-hydroxyanthraquinone (YOSHIDA et al, 1968), mais ce n'est pas le cas de la lutéoskyrine.

3) La présence de groupements hydroxyles libres devrait être détectée par absorption infrarouge et par RMN protonique.

Les spectres d'absorption IR de Ls et Rg dissous dans du tétrachlorure de carbone montrent (fig. 9) une bande résolue à 3620 cm^{-1} et de nombreuses bandes se chevauchant dans la région de 3000 cm^{-1}. La bande à 3620 cm^{-1}, située à l'emplacement des vibrations de valence des OH libres (VINOGRADOV et LINNEL, 1971), est attribuée aux groupements OH en 2 et 2' de Ls et Rg puisqu'elle disparaît dans le composé acétylé : 2,2'-diacétylrugulosine (Di Ac Rg) (BOUHET et al, b). Par deutération des pigments, on observe une meilleure résolution des bandes dans la région de 3000 cm^{-1}, et une apparition de nouvelles bandes dans la région de 2200 cm^{-1} (KIRCHENBAUM et al) . Les résultats suggèrent l'existence des vibrations de valence des -OH fortement chélatés intramoléculairement (FLETT 1948, HADZI et SHEPPARD 1954, BLOOM et al 1959, MUSSO et SEEGER 1960). L'absence de bande d'absorption dans la région 3300 - 3500 cm^{-1} indique l'absence de liaison H interne faible (TICHY , 1965) du type

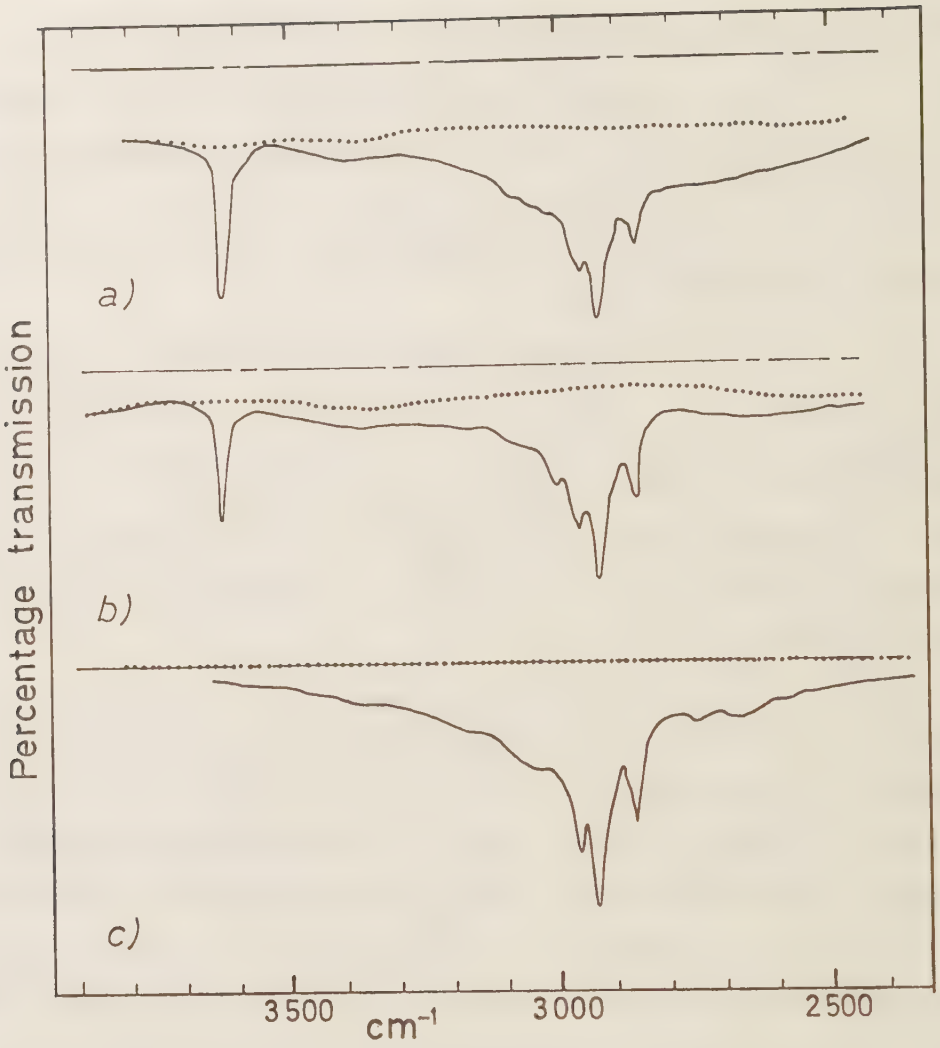


FIGURE 9 - SPECTRES IR

dans la région des vibrations de valence des -OH des solutions dans le CCl_4 de :

a) lutéoskyrine { c = $6{,}010^{-5}$ M/L (solubilité max.)
(trajet optique l=5 cm)

b) rugulosine { c = $5{,}010^{-5}$ M/L (solubilité max.)
l = 5 cm

c) 2-2'-diacétylrugulosine (DiAcRg)
{ c = $4{,}8.10^{-3}$ M/L
l = 1mm

$O_{10}...H - O_{4'}$ ou de liaison H intermoléculaire (PIMENTEL et CLELLAN, 1960) due aux groupements OH_5 et $_{5'}$, libres par exemple. De plus, les positions des bandes de valence des carbonyles (Rg : 1620 cm^{-1} et 1690 cm^{-1} , Ls : 1615 cm^{-1}) suggèrent que les (C=O) en 10 et 10' de Ls et Rg sont fortement chélatés avec les groupements (OH) vicinaux comme dans le cas des périhydroxy- naphtoquinones (MUSSO et SEEGER, 1960) ou - anthraquinones (FLETT 1948, HADZI et SHEPPARD 1954, BLOOM et al 1959, JOSIEN et FUSON 1952).

Les spectres de RMN conduisent aux mêmes conclusions . L'attribution des protons des groupements hydroxyles de Ls , Rg et Di Ac Rg , en solution dans le chloroforme est représentée dans le tableau 3 (TOMA et al a, BOUHET et al b) . Dans ce tableau nous avons également reproduit des résultats (MOORE et SCHEUER, 1966) de certains hydroxynaphtoquinones à titre de comparaison.

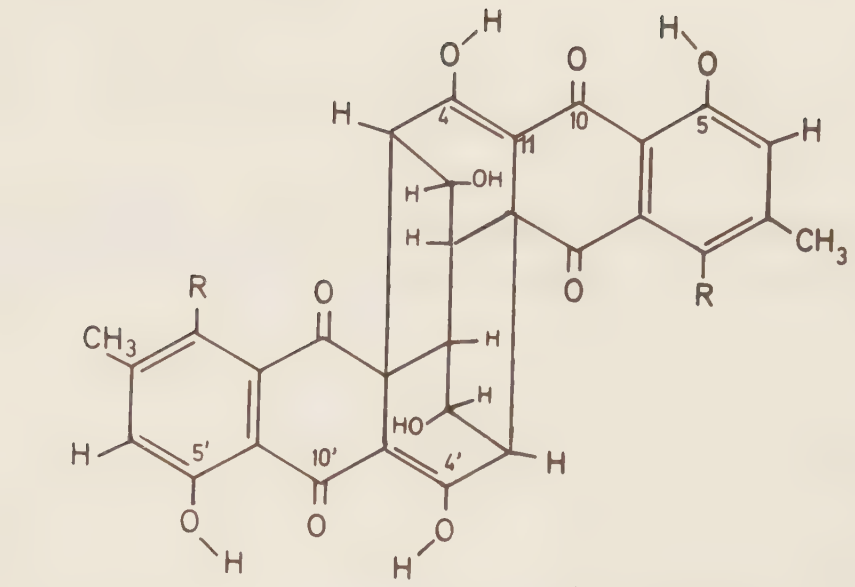
Les protons $O\underline{H}_{22'}$ sont situés dans la zone des déplacements chimiques correspondant aux O<u>H</u> libres (DYER 1970, EMSLEY et al 1965). Par contre, les protons correspondant aux groupements O<u>H</u> en 4 - 4' , 5 - 5' et 8 - 8' sont très déplacés vers les champs faibles, comme dans le cas des O<u>H</u> fortement chélatés intramoléculairement des périhydroxynaphtoquinones (MOORE et SCHEUER, 1966).

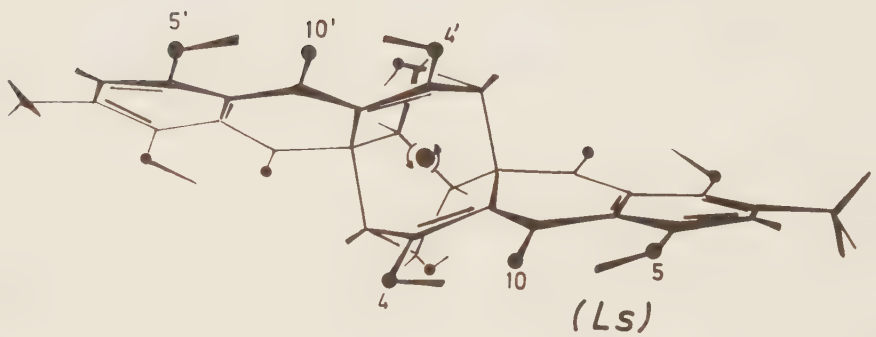
δ_{ppm}	$OH_{4-4'}$	$OH_{5-5'}$	$OH_{8-8'}$	$OH_{2-2'}$
Lutéoskyrine	14,73	11,55	12,44	4,8
Rugulosine	14,65	11,65		4,7
Di Ac Rg	14,65	11,55		
Juglone		OH_1 : 11,93		
Naphtazarine		OH_1 : 12,43	OH_4 : 12,43	

TABLEAU 3 - Déplacements chimiques (δ_{ppm}/TMS) du proton des groupements -OH des solutions de colorants dans $CDCl_3$.

CONCLUSION

Les résultats obtenus convergent tous vers la même conclusion à savoir l'existence de liaisons hydrogènes intramoléculaires fortes dans les molécules Ls et Rg . La conformation la plus plane (PP)-(voir figure 10) semble ainsi favorisée dans la majorité des solvants étudiés. Cette conformation doit, comme c'est effectivement le cas (cf. 2ème et 3ème parties), favoriser la formation des polychélates ordonnés entre les pigments (Ls, Rg) et les ions divalents, et permettre de comprendre certaines associations entre ces pigments et les acides nucléiques.





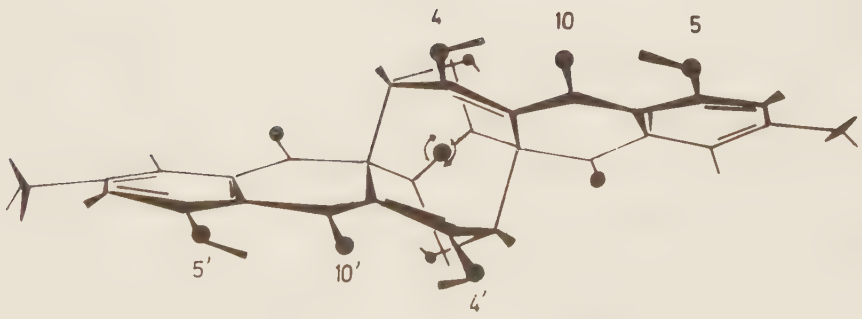


FIGURE 10 - CONFORMATION (P-P) DE Ls ET Rg EN SOLUTION.

1ère PARTIE - CHAPITRE III

ETUDE PAR DICHROISME CIRCULAIRE MAGNETIQUE DES DIRECTIONS DE POLARISATION DES MOMENTS DE TRANSITION DE Ls , Rg ET QUINONES ANALOGUES.

-:-:-:-:-

INTRODUCTION

La connaissance de la nature et de la direction des transitions électroniques de Ls et Rg doit permettre (ROSE, 1971) de préciser la structure des complexes entre ces pigments et les acides nucléiques.

Il résulte des études précédentes que la lutéoskyrine et la rugulosine adoptent en solution une conformation biplanaire (Fig. 10) et que les chromophores de ces pigments sont comparables à des polyhydroxynaphto-ou anthraquinones (PHAM VAN et al, 1973). L'attribution de transitions électroniques et de leurs directions de polarisation dans le cas des quinones (SIDMAN 1956 et 1957, LABHART 1957 et 1961, POPOV et al 1958 et 1962, KUBOYAMA et al 1966 et 1967, LEIBOVICI et DESCHAMPS 1966, DROTT et DEARMAN 1967, INOUE et al 1972), devrait permettre d'en déduire celle de Ls et Rg , en supposant que la présence de carbones tétravalents ne perturbe pas profondément les propriétés électroniques de la molécule. De telles attributions sont habituellement faites à l'état solide et à basse température (SIDMAN 1956, POPOV et al 1958 et 1962, SCOTT et WATSON 1968, PLATONA et al 1969, INOUE et al 1972).

Le dichroïsme circulaire magnétique (DCM) devrait, par contre, permettre ce type d'étude en solution et à la température ambiante (FOSS et McCARVILLE 1966 et 1967, STEPHENS et al 1968, BRIAL et al 1967 et 1968, VOELTER et al 1969, TOLLIN 1968, HOLLEBONE et al 1969, DEARMAN 1973).

Nous présentons ici les résultats obtenus en DCM et en absorption électronique des composés : naphtoquinone 1-4 ,

juglone, anthraquinone 9-10, chrysophanol, quinizarine, lutéoskyrine et rugulosine.

Nous avons relié les signaux DCM des quinones et hydroxyquinones aux attributions électroniques données par la littérature. Ceci nous a permis de déduire une attribution des transitions électroniques de Ls et Rg .

RESULTATS ET DISCUSSION

Les dérivés naphto ou anthraquinoniques, n'ayant pas d'axe de symétrie d'ordre trois ou supérieur, ne présentent pas de dégénérescence à l'état fondamental et à l'état excité (KUBOYAMA, 1958). Le DCM de ces composés peut alors être représenté par une expression simplifiée (BUCKINGHAM et STEPHENS 1966, SCHATZ et McCAFFERY 1969, STEPHENS 1970, CALDWELL et al 1971) de la forme :

$$\Delta \varepsilon_M = b . \varepsilon . f(\nu)$$

où $f(\nu)$ est une fonction d'absorption , ε l'absorbance molaire de la transition considérée et b un coefficient. Dans le cas de deux niveaux excités 1 et 2, énergétiquement proches et couplés magnétiquement, b est proportionnel au produit mixte $\vec{m}_{12} \cdot (\vec{\mu}_{01} \wedge \vec{\mu}_{02}) / \Delta E_{12}$ où $\vec{\mu}_{01}$ et $\vec{\mu}_{02}$ représentent des moments électriques de deux transitions $0 \rightarrow 1$ et $0 \rightarrow 2$, entre le niveau fondamental et les niveaux excités 1 et 2 séparés par une énergie ΔE_{12} et couplés par un moment magnétique $\vec{m}_{12}$. Cette expression est maximum dans le cas où les transitions considérées sont orthogonales et proches énergétiquement. Les bandes DCM dans les régions des transitions $0 \rightarrow 1$ et $0 \rightarrow 2$ sont alors théoriquement égales et de signes opposés (FOSS et McCARVILLE 1967, TINOCO et BUSH 1964). Dans les composés où il existe plusieurs transitions électroniques, les couplages entre ces différentes transitions sont susceptibles de donner un spectre DCM plus compliqué. L'existence de modes de vibrations perpendiculaires peut également rendre plus difficile l'interprétation des spectres DCM.

1) Etude des quinones et hydroxyquinones

De nombreux auteurs ont étudié les spectres d'absorption UV-visible des quinones et hydroxyquinones (MORTON et EARLAM 1941, SPRUIT 1949, HARTMANN et LORENTZ 1952, PETERS et SUMNER 1953, BIRKINSHAW 1955). Les résultats expérimentaux (SIDMAN 1956 et 1957, LABHART 1957 et 1961, POPOV 1958, POPOV et SMIRNOV 1962, PLATONA et al 1969, KUBOYAMA et YABE 1967, FROTT et DEARMAN 1967, SCOTT et WATSON 1968, INOUE et al 1972) et théoriques (INOUE et al 1972, KUBOYAMA 1958, KUBOYAMA et WADA 1966, LEIBOVICI et DESCHAMPS 1966) concernant l'attribution des transitions électroniques et de leur direction de polarisation, ainsi que nos résultats en DCM sont résumés dans la figure 11. Les attributions de la littérature sont figurées par des lettres (en majuscule et minuscule respectivement pour les résultats expérimentaux et théoriques). La convention adoptée pour les directions est celle de MULLIKEN (MULLIKEN, 1955) selon laquelle le plan de la molécule est défini par les axes YZ, l'axe Z passant par les carbonyles. Les bandes DCM sont représentées par des pointillés pour la région $n-\pi^*$ et des traits continus pour la région $\pi-\pi^*$ (trait épais ou fin selon que la transition est attribuée ou non).

a - Naphtoquinone 1-4 et juglone

Les spectres de DCM et d'absorption de la naphtoquinone 1-4 (courbe supérieure) et de la juglone (courbe inférieure) sont représentés dans la figure 12.

Dans la région des transitions $\pi-\pi^*$ (longueurs d'onde inférieures à 380 nm et 480 nm pour la naphtoquinone et la juglone respectivement), les spectres DCM de ces composés présentent quatre bandes associables deux à deux. Les deux premières bandes DCM, pour $\lambda < 270$ nm, de signes opposés, d'intensité comparable et ne variant pas avec les solvants (hexane, éthanol 95 %) révèlent (FOSS et McCARVILLE, 1967) l'existence de deux transitions électroniques polarisées perpendiculairement, comme cela a été récemment observé pour l'anthraquinone et pour les amino anthraquinones

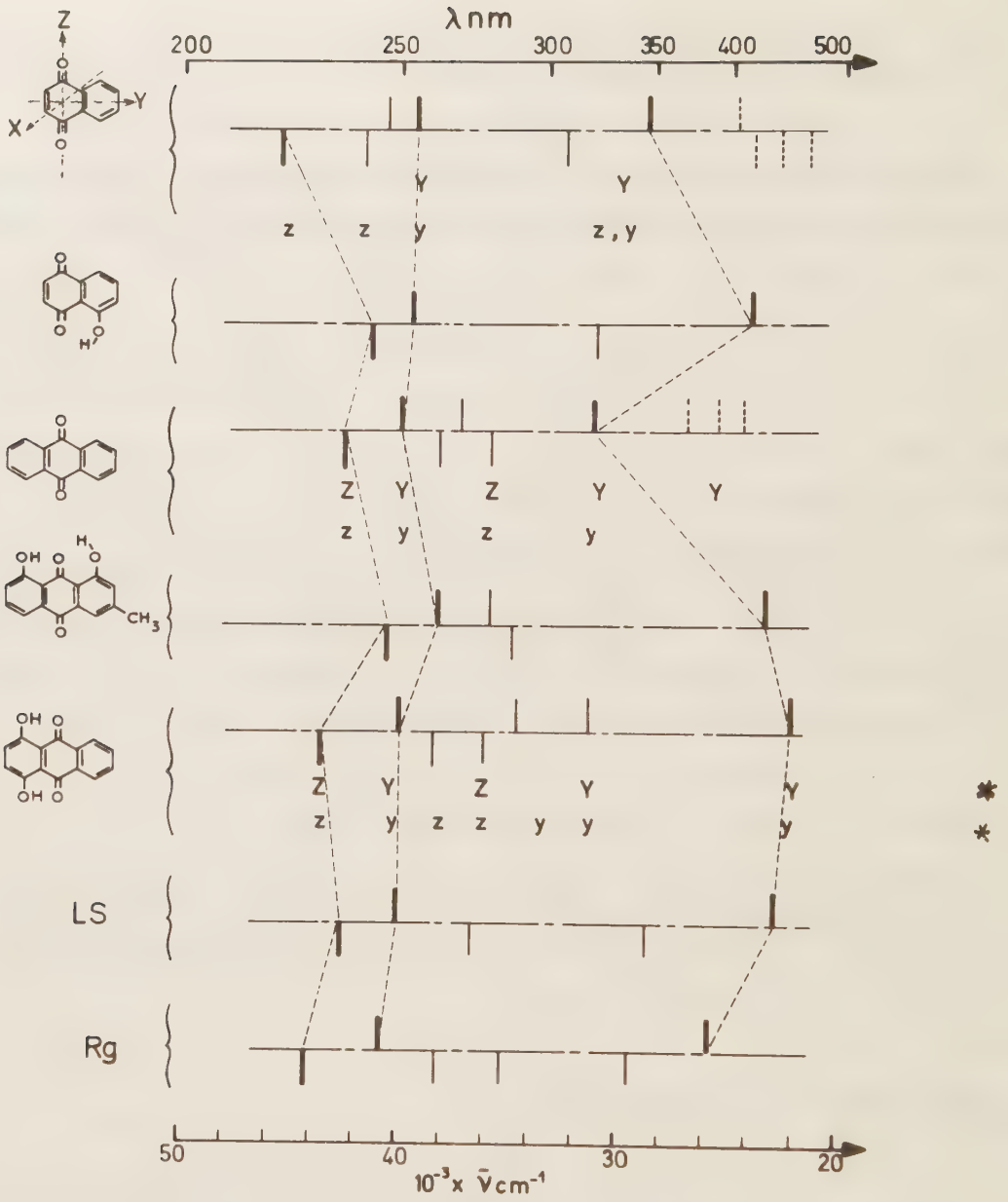


FIGURE 11 - SCHEMA RECAPITULATIF

des résultats de DCM (traits verticaux) et des attributions antérieures (voir texte).

* Résultats concernant les amino-anthraquinones correspondantes.

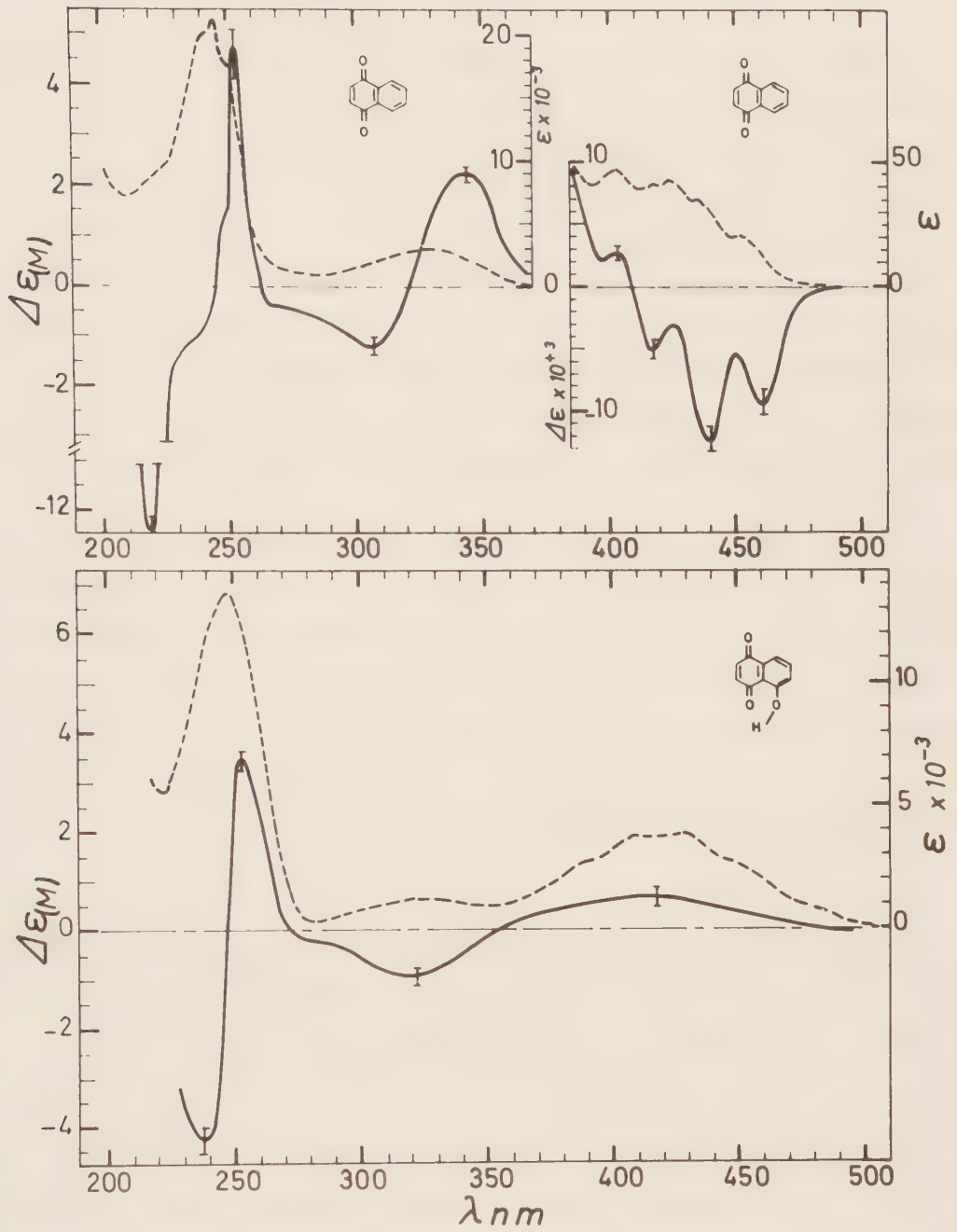


FIGURE 12 - Courbe supérieure : NAPTHOQUINONE 1-4 en solution dans l'hexane (région $\pi-\pi^*$) et dans l'éther (région $n-\pi^*$).

Courbe inférieure : JUGLONE en solution dans l'hexane.

(voir légende fig. 13).

(INOUE et al 1972). Deux autres bandes DCM situées à des longueurs d'onde supérieures à 270 nm, de signes opposés et d'intensité relative similaire dans différents solvants (hexane, éther, dioxanne ,éthanol 95 %), conduisent aussi à conclure à l'existence d'un autre couple de transitions orthogonales. Notons que la présence de deux transitions dans l'unique bande d'absorption vers 325 nm de la naphtoquinone avait été prévue par des études théoriques (LEIBOVICI et DESCHAMPS, 1966) mais n'avait jamais été décelée par aucune autre méthode expérimentale antérieure (SIDMAN 1956 et 1957, SPRUIT 1949, HARTMANN et LORENTZ 1952, PETERS et SUMNER 1953).

Dans la région des transitions $n-\pi^*$ (360-500 nm) les bandes DCM de la naphtoquinone reflètent la structure vibrationnelle (MULLIKEN, 1955) de la région d'absorption correspondante. Pour la juglone, les bandes $n-\pi^*$ n'ont pu être observées, sans doute à cause du recouvrement des transitions $n-\pi^*$ et $\pi-\pi^*$.

b - Anthraquinone 9-10 et dérivés hydroxylés

Le spectre DCM de l'anthraquinone 9-10 (AQ) présente (Fig. 13), comme précédemment, deux bandes intenses et opposées dans la région des longueurs d'onde inférieures à 260 nm. Dans la région (260 - 300 nm) le spectre DCM est plus difficile à interpréter. Nous observons, comme l'a signalé DEARMAN (1973), au moins deux bandes DCM de signes opposés alors que les méthodes expérimentales utilisées antérieurement n'en avaient montré qu'une seule vers 275 nm. Cette complexité pourrait être attribuée soit à l'existence de transitions électriquement interdites (KUBOYAMA et WADA 1966, LEIBOVICI et DESCHAMPS 1966), soit à l'interaction de composantes vibrationnelles (SEAMANS et MOSCOWITZ, 1972). Pour des longueurs d'onde supérieures, on observe une bande positive associée à la bande d'absorption vers 325 nm. Dans la région des transitions $n-\pi^*$ (360 - 460 nm) les bandes DCM observées ont le même signe que celui de la bande à 325 nm. Ce résultat, en accord avec ceux obtenus en polarisation d'absorption et d'émission (SCOTT et WATSON, 1968, KUBOYAMA et YABE 1967, DROTT et DEARMAN 1967), confirme l'hypothèse de l'identité des directions de

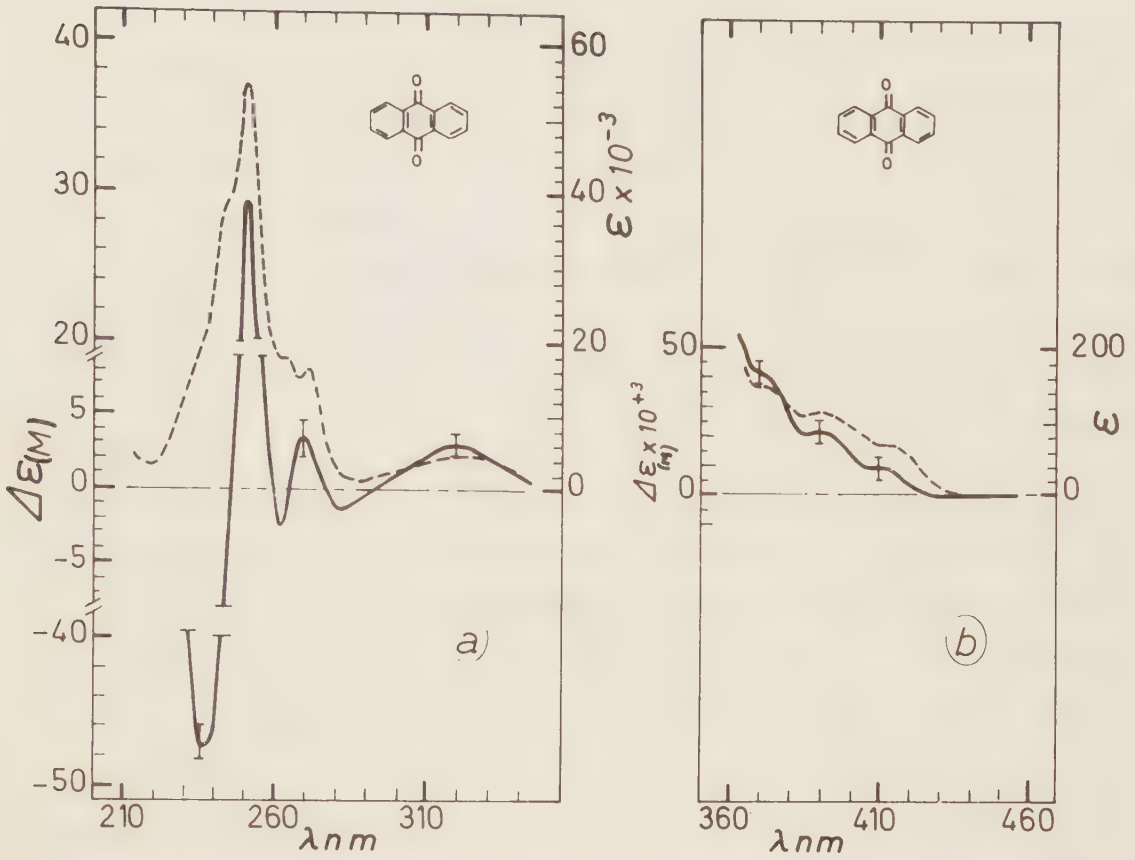


FIGURE 13 - ANTHRAQUINONE 9-10 (solution dans le dioxanne)

a) région des transitions π-π*

b) région des transitions n-π*

——— : dichroïsme circulaire magnétique (DCM)

..... : absorption UV-visible

ε : absorbance molaire (échelle de droite)

$\Delta\varepsilon_{(M)}$: $(\varepsilon_G - \varepsilon_D)_{\text{magnétique}}$, absorbance différentielle molaire pour un champ magnétique de 70 kG (échelle de gauche)

ε et $\Delta\varepsilon_{(M)}$ sont exprimés en $\text{mole}^{-1}.\text{l}.\text{cm}^{-1}$

Le trait I représente le bruit de fond du signal DCM.

polarisation de ces transitions $\pi-\pi^*$ et $n-\pi^*$.

Les spectres d'absorption et de DCM des anthraquinones hydroxylés en solution dans l'hexane (a) et dans la soude 0,1 N (b) sont représentés dans les figures 14 et 15 . La bande DCM positive en milieu organique, centrée vers 430 nm pour le chrysophanol (fig.14) et 470 nm pour la quinizarine (fig. 15) est de même nature que celle à 325 nm de l'anthraquinone (POPOV et SMIRNOV 1962, KUBOYAMA 1958). Ni l'intensité relative, ni le signe de cette bande ne varient avec les solvants : hexane, dioxanne, éthanol 95 % - vraisemblablement en raison des liaisons hydrogènes intramoléculaires fortes (DUMAS et al, 1972). La déprotonation des groupements hydroxyles en solution aqueuse ou alcoolique basique (NaOH 0,1 N) entraîne par contre un changement de signe de cette bande - probablement à cause (McCARVILLE, 1967) de l'augmentation de densité de charge. Dans la région de 250 nm, on retrouve deux bandes intenses et opposées et, dans la région intermédiaire (260 - 360 nm) plusieurs bandes. Dans cette région, les directions de polarisation dépendent de la position des substituants (KUBOYAMA, 1958), ce qui explique les signes différents des bandes DCM du chrysophanol et de la quinizarine.

c - Direction de polarisation et dichroisme circulaire magnétique

De nombreux auteurs ont utilisé le DCM pour déterminer les directions relatives de polarisation de composés organiques (FOSS et McCARVILLE 1966, BRIAT et DJERASSI 1968, VOELTER et al 1969, TOLLIN 1968, HOLLEBONE et al 1969, DJERASSI et al 1971), au même titre que la polarisation de phosphorescence (DEARMAN, 1973). Pour une détermination absolue il faudrait comparer les résultats DCM avec par exemple ceux des études de polarisation d'absorption de monocristal.

Le rapprochement d'une part des résultats de DCM des quinones étudiées et d'autre part des attributions de transitions électroniques de ces produits [obtenues par des méthodes absolues et relatives (SIDMAN 1956 et 1957 , LABHART 1957 et 1961, POPOV 1958, POPOV et SMIRNOV 1962, PLATONA et al 1969, KUBOYAMA et YABE 1967, DROTT et DEARMAN 1967, SCOTT et WATSON 1968, INOUE et al 1972, KUBOYAMA 1958, KUBOYAMA et WADA 1966, LEIBOVICI et DESCHAMPS 1966)], montre qu'il existe, pour

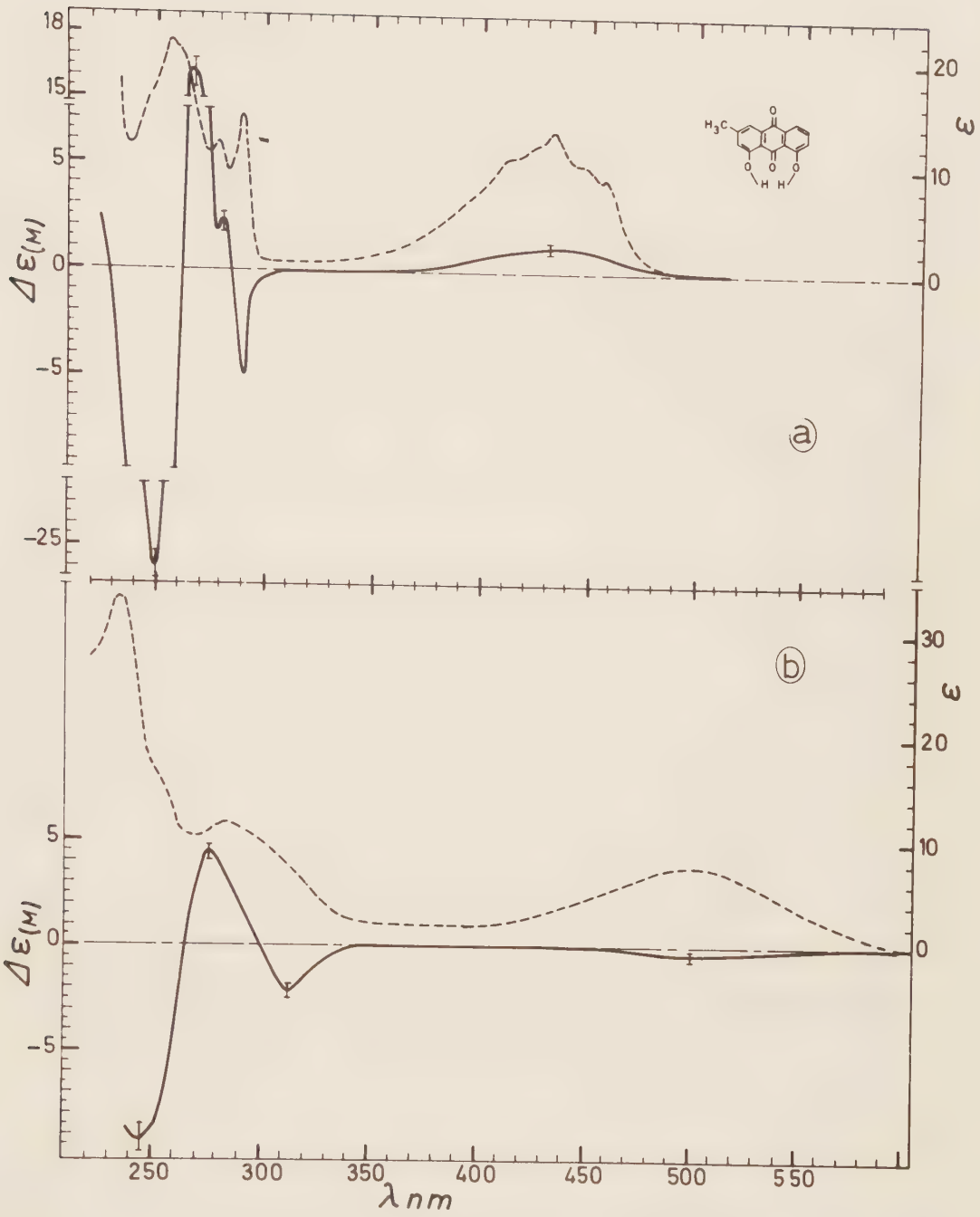


FIGURE 14 - CHRYSOPHANOL

a) en solution dans l'hexane

b) en solution dans la soude 0,1 N.

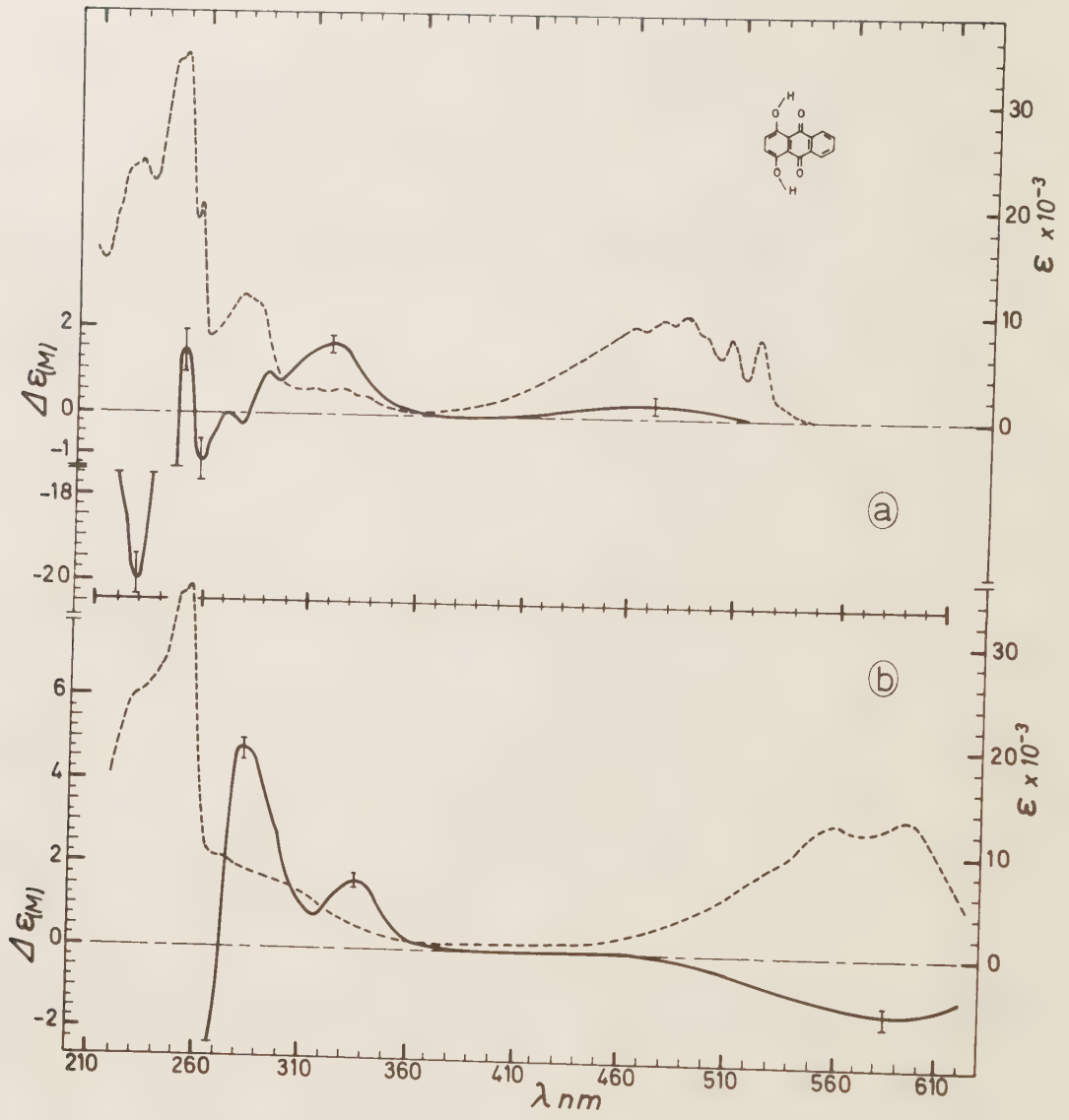


FIGURE 15 - QUINIZARINE

a) en solution dans l'hexane

b) en solution dans la soude 0,1 N.

trois transitions caractéristiques, une corrélation entre signe du DCM et direction de polarisation.

Ces résultats sont représentés dans la Fig.11 par des traits épais vers 220 nm (Z) , 250 nm (Y) et vers 330 nm pour les quinones et vers 410-460 nm pour les hydroxyquinones (Y). Pour les autres transitions, notamment dans la région intermédiaire (260 - 310 nm) les spectres DCM sont différents pour les napthoquinones et les anthraquinones.

2) Etude de la lutéoskyrine et de la rugulosine

Les spectres d'absorption électronique, de dichroisme circulaire naturel et magnétique de Ls et Rg sont représentés dans les fig. 16 et 17 . En raison de la faible intensité des bandes DCM nous avons dû confirmer l'existence de celles-ci en utilisant des solutions de pigments à différentes concentrations, dans des solvants variés (dioxanne, éther, isobutanol, éthanol 95 %).

Malgré la présence de carbones tétravalents dans Ls et Rg, les spectres DCM de ces pigments sont semblables à ceux des hydroxyanthraquinones . On retrouve notamment les trois bandes DCM : à 225 nm (négative), à 245 nm (positive) et vers 410-450 nm (positive, changeant de signe en milieu basique)*). Ces résultats suggèrent que les moments de transitions correspondants de Ls et Rg possèdent des composantes polarisées essentiellement dans les mêmes directions que celles des analogues quinoniques. L'intensité plus faible de la bande DCM vers 400-450 nm de Ls par rapport à celle de Rg ou du chrysophanol serait dûe à l'augmentation de la composante selon X causée par le présence des deux OH en 8 et 8' dans Ls.

---

*) Remarque - à pH 8, la Ls et la Rg sont déjà sous forme basique (Ls , pK_a = 7,0 ; Rg , pK_a = 6,7).
Par contre, les hydroxyanthraquinones ont des pK_a voisins de 10. L'emploi de soude 0,1 N est nécessaire pour déprotoner ces molécules.

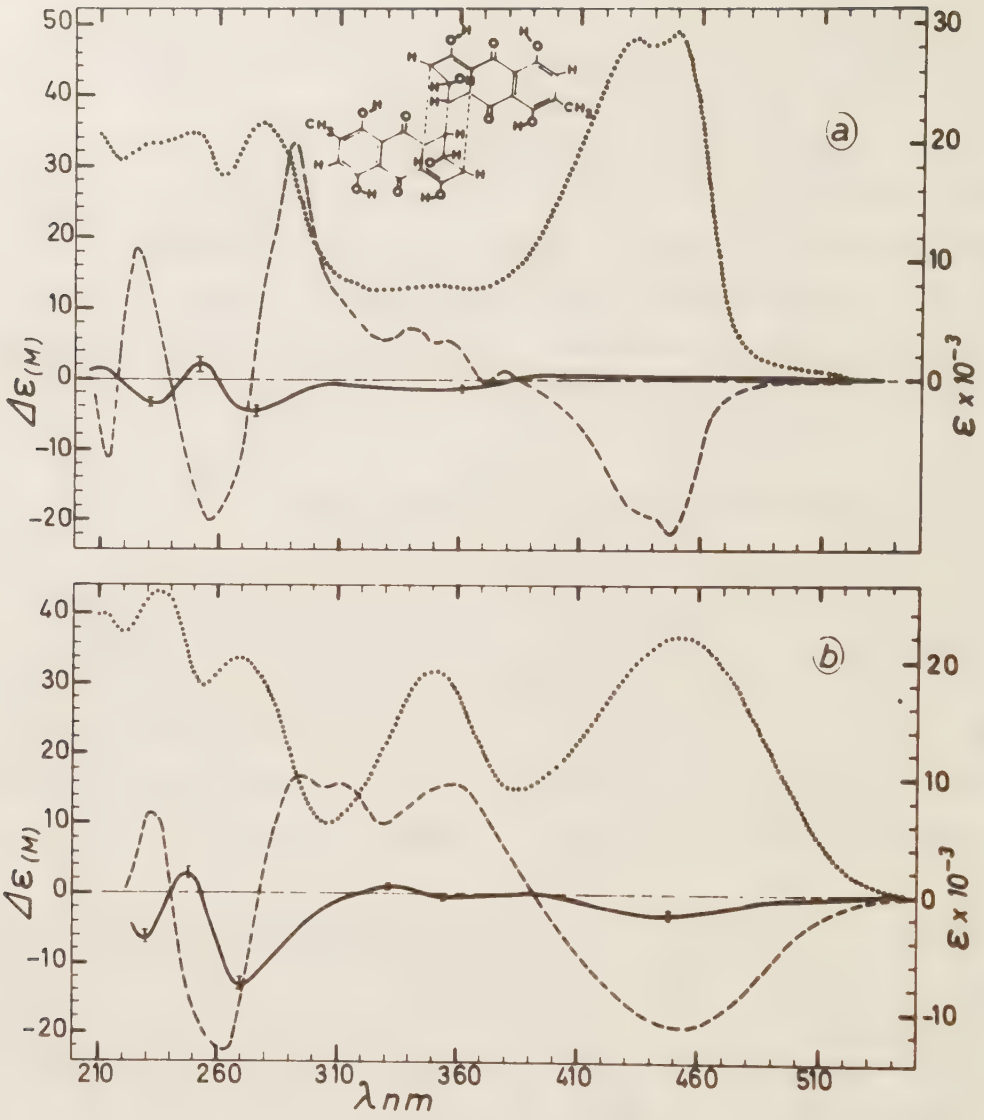


FIGURE 16 - LUTEOSKYRINE

a) en solution dans l'isobutanol

b) en solution dans le tampon pH 9 (glycine/NaOH)

——— : courbe de DCM, corrigée du DC

----- : courbe de DC

····· : courbe d'absorption UV-visible

ε : absorbance molaire (échelle de droite)

$\Delta\varepsilon_{(M)}$: absorbance différentielle molaire en absence (DC) ou en présence (DCM) d'un champ magnétique de 70 kG (échelle de gauche).

ε et $\Delta\varepsilon_{(M)}$ sont exprimés en $mole^{-1}.l.cm^{-1}$.

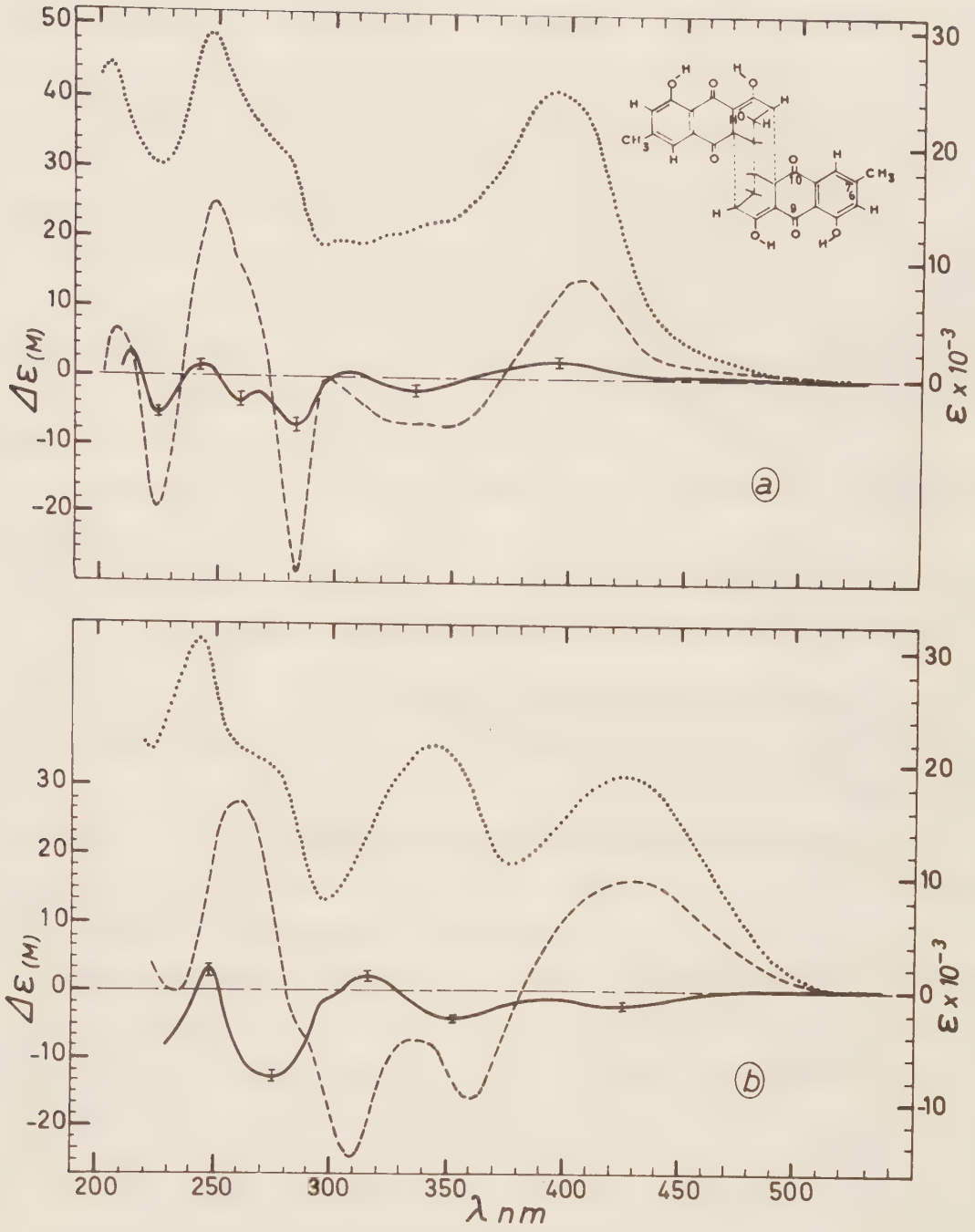


FIGURE 17 - RUGULOSINE

(voir légendes Fig. 16).

En conclusion, la comparaison avec les quinones des spectres d'absorption et de DCM des pigments mous permet :

1) d'associer la bande d'absorption du visible ($\lambda > 380$ nm dans le cas de Ls et $\lambda > 360$ nm dans celui de Rg), à une transition $\pi-\pi^*$ (voir chapitre précédent) polarisée principalement dans la direction longitudinale (selon Y). Cette bande possède une structure vibrationnelle(décelable en absorption, en DC et en fluorescence) dont la résolution diminue avec l'augmentation de la polarité du solvant.

2) de relier la bande d'absorption vers 245nm à une transition $\pi-\pi^*$ de direction parallèle à Y .

3) d'associer la bande vers 225 nm, mieux séparée en DC qu'en absorption notamment dans le cas de la rugulosine, à une transition $\pi-\pi^*$ polarisée transversalement (selon X)

L'examen des spectres obtenus à l'aide de ces trois techniques, ainsi que la comparaison des spectres de Ls avec ceux de Rg, suggèrent en outre :

1) que la transition électronique vers 205 nm est polarisée selon Y

2) que les deux transitions observées dans la région 255-300 nm (mieux séparées dans le cas de Rg que dans celui de Ls) sont polarisées selon Z.L'effet excitonique (voir 3ème partie) dans cette région du spectre de DC indique que ces transitions sont situées dans deux plans parallèles proches. Ces résultats sont compatibles avec l'attribution de ces transitions à des délocalisations électroniques vraisemblablement selon $C_{11} - C_4 - O_4$ et $C_{11'} - C_{4'} - O_{4'}$ dans les deux moitiés de la molécule.

3) que dans la région 300 - 370 nm, il existe - comme le suggèrent les spectres de DC et DCM - deux transitions parallèles en milieu organique et polarisées selon les carbonyles. En milieu basique (pH 8) - lorsque les $OH_{4-4'}$ et $OH_{5-5'}$ sont déprotonnés (voir le chapitre suivant), l'inversion du signe de l'une des bandes de DCM (celle vers 320 nm)et non de l'autre, pourrait traduire une répartition de densité de charge différente pour ces deux transitions (McCARVILLE ,1967).

MATERIELS ET METHODES

Les quinones et hydroxyquinones, Fluka, "Purum" ou "Puriss" sont recristallisées deux fois dans l'éthanol ou l'acide acétique glacial. La naphtoquinone et l'anthraquinone sont, en outre, sublimées.

Les concentrations des solutions de quinones sont déterminées après pesées sur une micro-électro-balance Cahn G2. Les valeurs des absorbances molaires (ε) observées sont comparables à celles de la littérature (MORTON et EARLAM 1941, SPRUIT 1949, BIRKINSHAW 1955).

Les solvants Merck Uvasol sont purifiés comme précédemment (PHAM VAN et al, 1973).

Les dilutions (de 10^{-2} à 10^{-5} M) et les trajets optiques (de 0,01 cm à 2 cm) choisis correspondent à une densité optique (DO) voisine de 1.

Les spectres de dichroïsme circulaire naturel (DC) et magnétique (DCM) sont enregistrés sur un dichrographe Jouan DC II modifié : passage automatique de tension constante à fente constante, champ de 70 kG créé par une bobine supra conductrice, numérisation automatique par codeurs reliés à un ordinateur PDP 12 (Equipement Digital).

1ère PARTIE - CHAPITRE IV

DETERMINATION DES pK DE Ls ET Rg

-:-:-:-:-

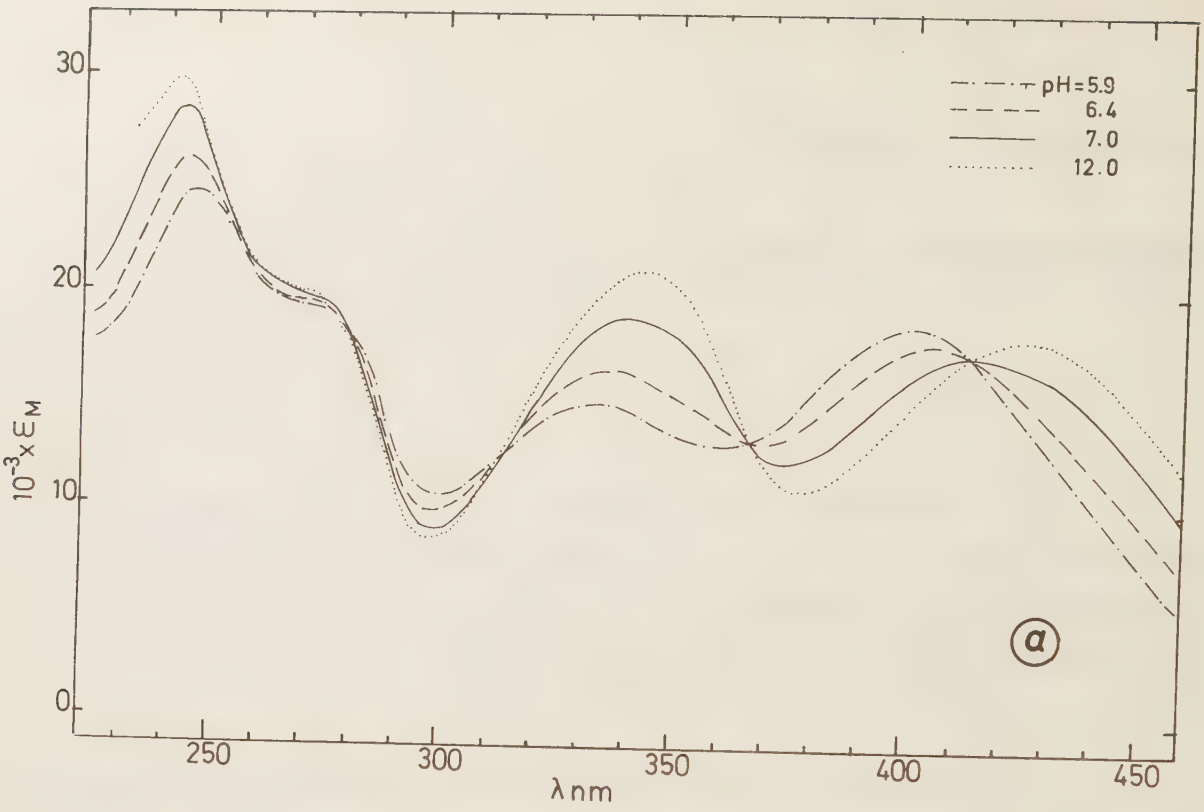
Les groupements fonctionnels (OH) de ces pigments étant impliqués dans les différentes interactions envisagées, la connaissance des valeurs des différents pK paraît *a priori* indispensable pour préciser la réactivité et l'importance relative du rôle de chacun de ces groupements.

Les pK de Ls et Rg ont été déterminés par spectrophotométrie d'absorption électronique et de dichroïsme circulaire. Les figures 18 (Rg) et 19 (Ls) montrent les spectres relatifs à ces deux techniques pour 4 valeurs de pH . La présence d'une seule série de points isobestes pour Rg et de deux séries pour Ls suggère la présence de deux et trois états ionisés pour Rg et Ls respectivement. Les variations d'absorbances molaire et différentielle à des longueurs d'onde caractéristiques sont représentées dans la figure 20 (Ls) et la figure 21 (Rg). D'après ces résultats, la lutéoskyrine présente deux pK ($pK_A = 6,8$; $pK_B = 12$) alors que la rugulosine n'en présente qu'un seul ($pK_A = 6,5$). Par comparaison avec Rg , le pK_B de 12 est attribuable à l'ionisation des groupements $OH_{8\ 8'}$ de Ls .

En ce qui concerne les pK_A , nous n'avons pu atteindre qu'une seule valeur pour Ls ou Rg bien que les formules chimique des pigments en laissent prévoir théoriquement deux (en tout quatre groupements -OH ionisables symétriques 2 à 2). L'impossibilité de mesurer dans l'eau, deux valeurs distinctes de pK_A pourrait s'expliquer

- soit parce que le pK_A est inférieur au pH de précipitation des pigments (≤ 6 pour Ls et $\leq 5,5$ pour Rg)

- soit en raison de la proximité des valeurs de pK_A .



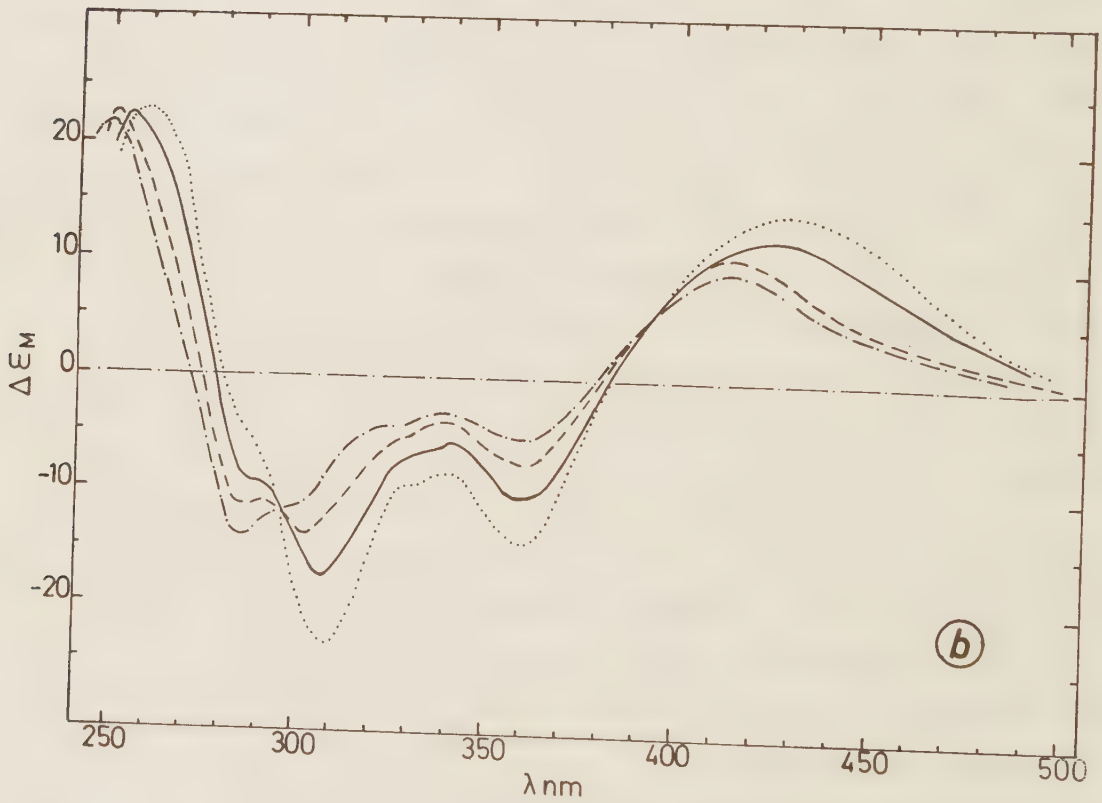


FIGURE 18 - TITRAGE DE Rg (milieu aqueux)

a) spectres d'absorption

b) spectres de DC (voir légendes a)

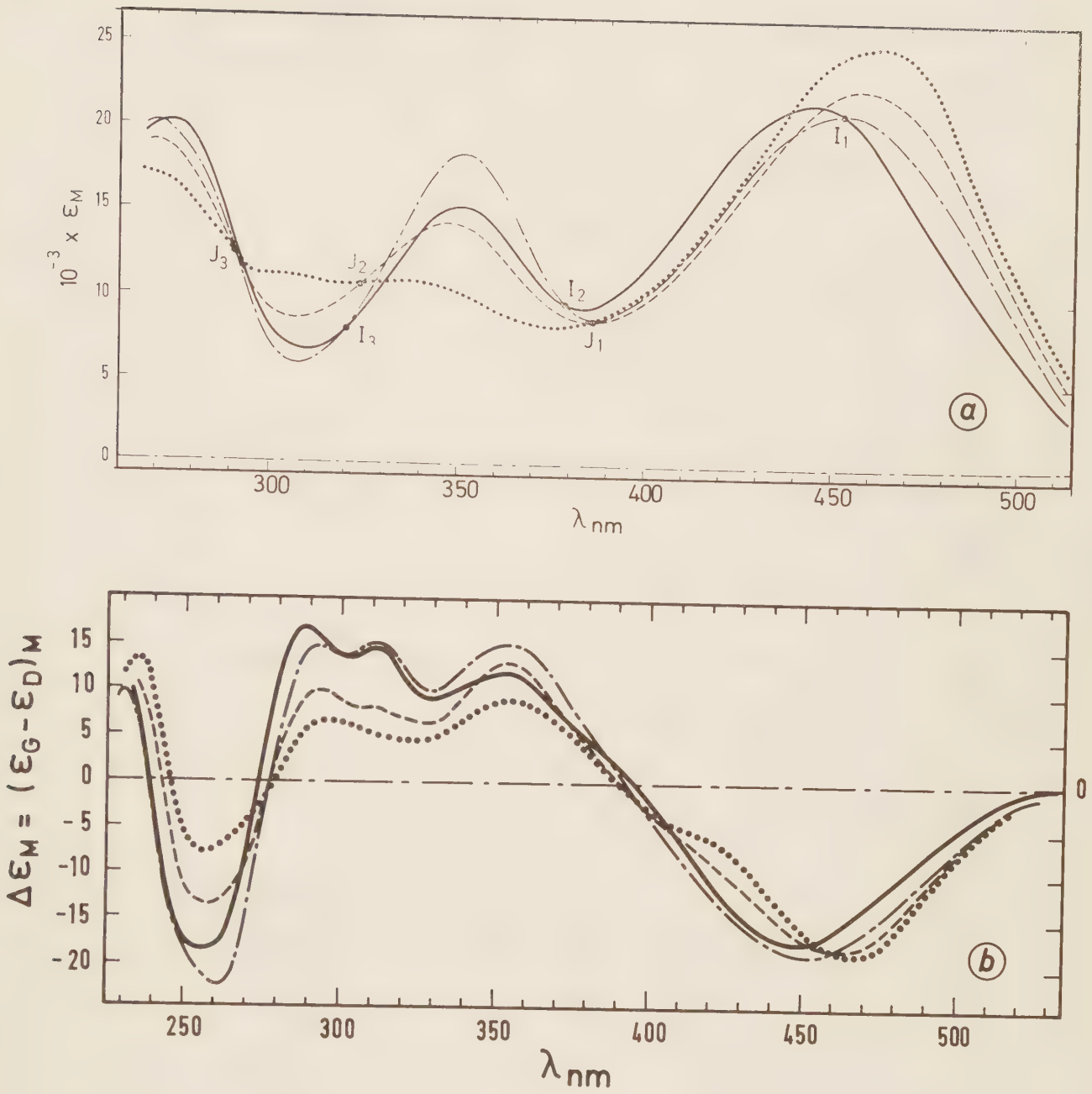


FIGURE 19 - TITRAGE DE Ls (milieu aqueux)

a) Spectres d'absorption de Ls à divers pH : —— pH 6,6
-·- pH 7,5
--- pH 11,9
··· pH 13,0

I_1, I_2, I_3 : points isobestes correspondant au pK_A

J_1, J_2, J_3 : points isobestes correspondant au pK_B

b) Spectres de dichroïsme circulaire de Ls aux mêmes pH que ci-dessus.

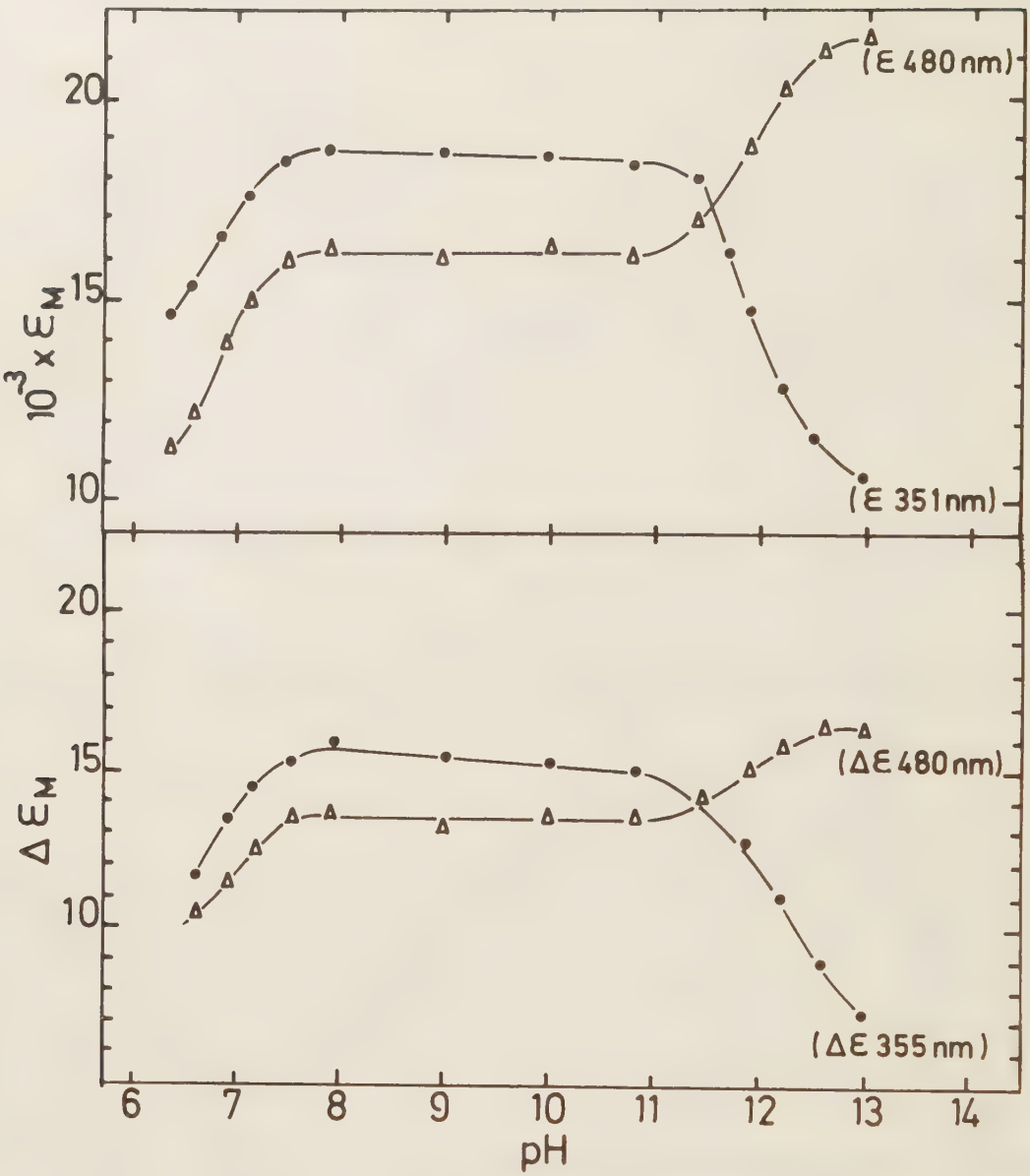


FIGURE 20 - DETERMINATION DES pK DE Ls (milieu aqueux)
Variations des coefficients d'extinction molaire (ε_M) et différentielle molaire ($\Delta\varepsilon_M$) en fonction du pH.
(Variations maximum aux longueurs d'onde choisies).

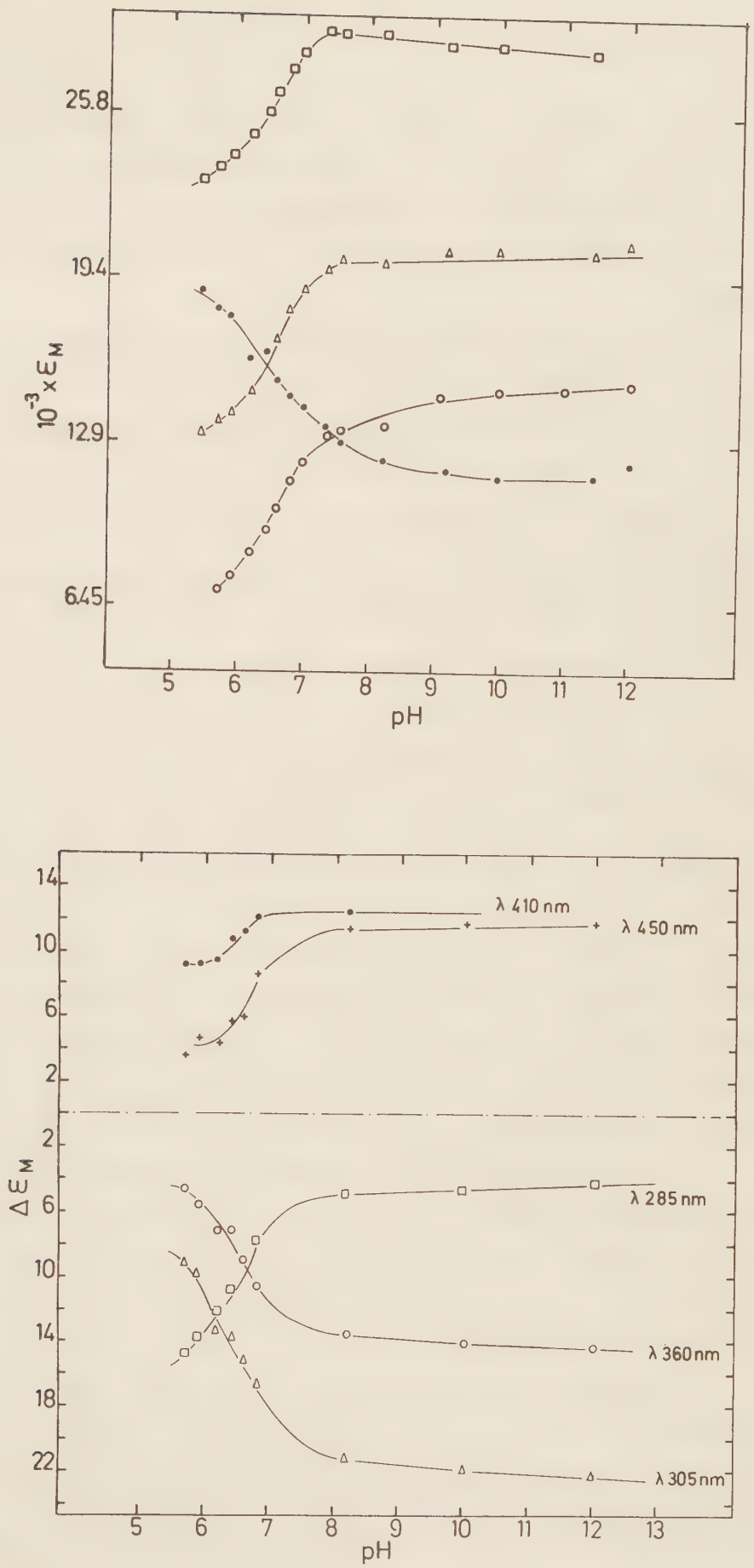


FIGURE 21 - DETERMINATION DU pK DE Rg (milieu aqueux)

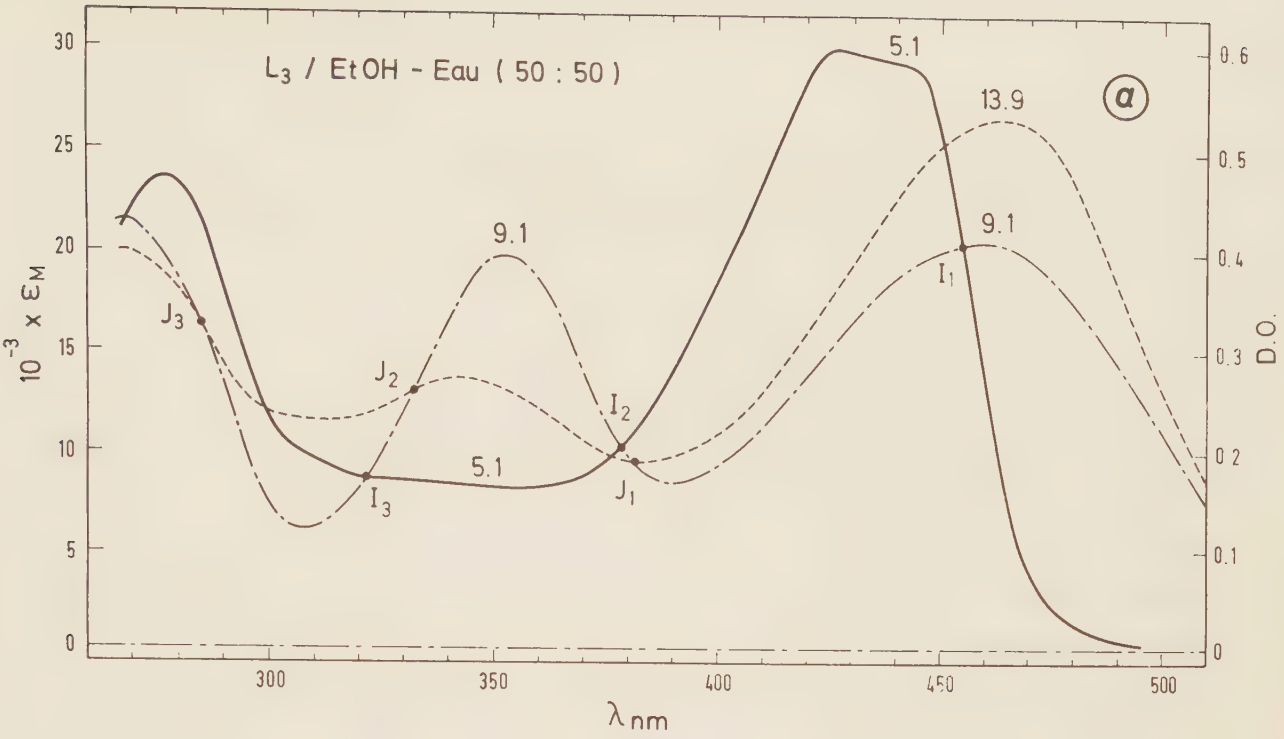
Pour ces deux raisons, nous avons effectué des titrages dans plusieurs systèmes de solvants (éthanol, méthanol, acétone, mélanges hydro-alcooliques, mélanges aqueux d'acétone, D.M.S.O. et dioxane) dont deux relatés ici suffisent à rendre compte du phénomène.

1) Les mélanges hydro-alcooliques (éthanol-eau et méthanol-eau) permettent de mesurer avec l'électrode de verre habituelle des valeurs de pH apparent qui sont assez proches (inférieur à 2 unités pH) des valeurs de pH dans l'eau (De LIGNY et al 1960, BATES et al 1963, GELSEMA et al 1965 , GABORIAUD 1966). De plus l'échelle d'acidité plus étendue que celle de l'eau (BATES et al 1963, CHARLOT 1966) et une meilleure solubilisation des phénols et acides organiques, justifient leur emploi dans le cas des pigments étudiés.

La figure 22a montre les spectres d'absorption de Ls à trois pH dans un mélange (éthanol-eau) (50v:50v), et la figure 22b permet d'avoir les valeurs des $pK_{app.}$ de Ls . Dans ce solvant, le pK_B de Ls est déplacé de 12 à 13,6 ; le pK_A se dédouble en 2 valeurs, l'une vers 6,5 et l'autre vers 8,0. Ces résultats appellent deux remarques : a) L'augmentation des valeurs des pK de la Ls est comparable à celle des phénols, crésols, xylénols et acides organiques titrés dans les mêmes conditions (dans le même solvant) (GELSEMA et al, 1965).
b) Les valeurs de pK_A de Ls ne sont pas très distinctes, en raison du "nivellement" par le solvant (BATES, 1954).

2) L'acétone et les mélanges (acétone-eau) qui sont moins "nivelants" que les solvants précédents, car moins dissociants, et qui présentent par ailleurs une échelle d'acidité plus étendue que celle des alcools, ont été utilisés pour améliorer la précision de mesures des pK_A de Ls et Rg .

La figure 23a représente les spectres d'absorption des solutions de rugulosine en solution dans l'acétone, titrées par addition d'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH). Deux séries de points isobestes I et J caractéristiques révèlent la présence de trois états d'ionisation distincts. La figure 23b montre que les changements d'états correspondent exactement à l'ionisation



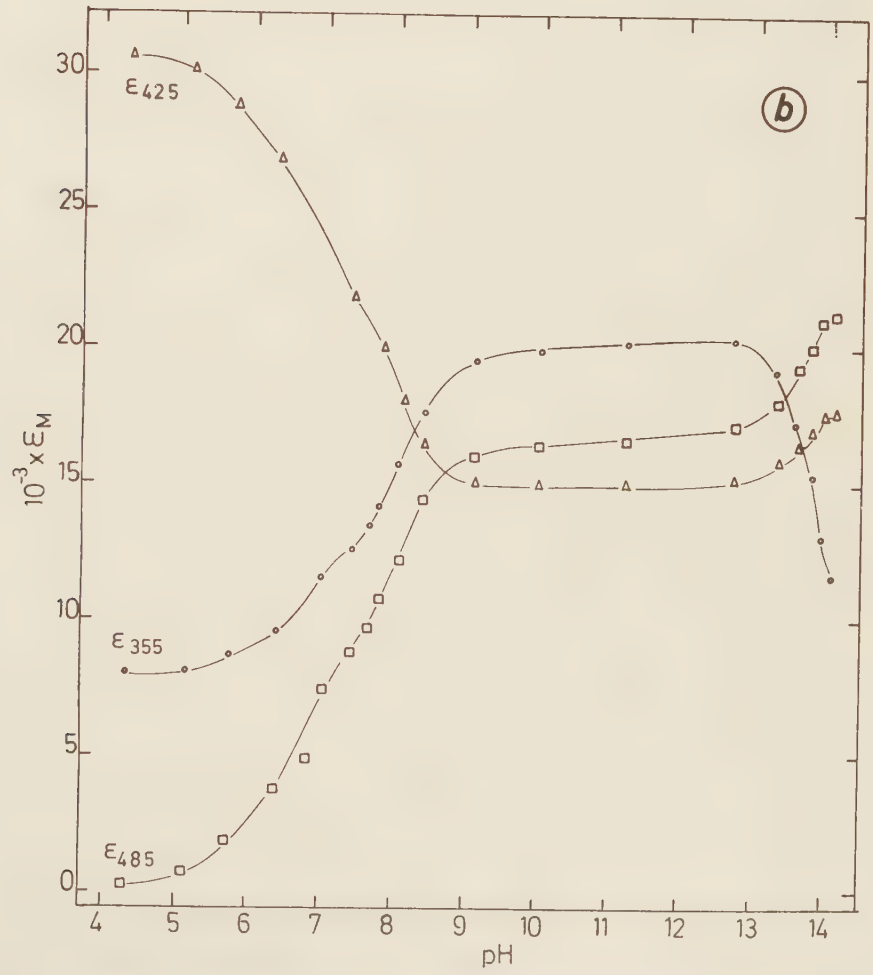
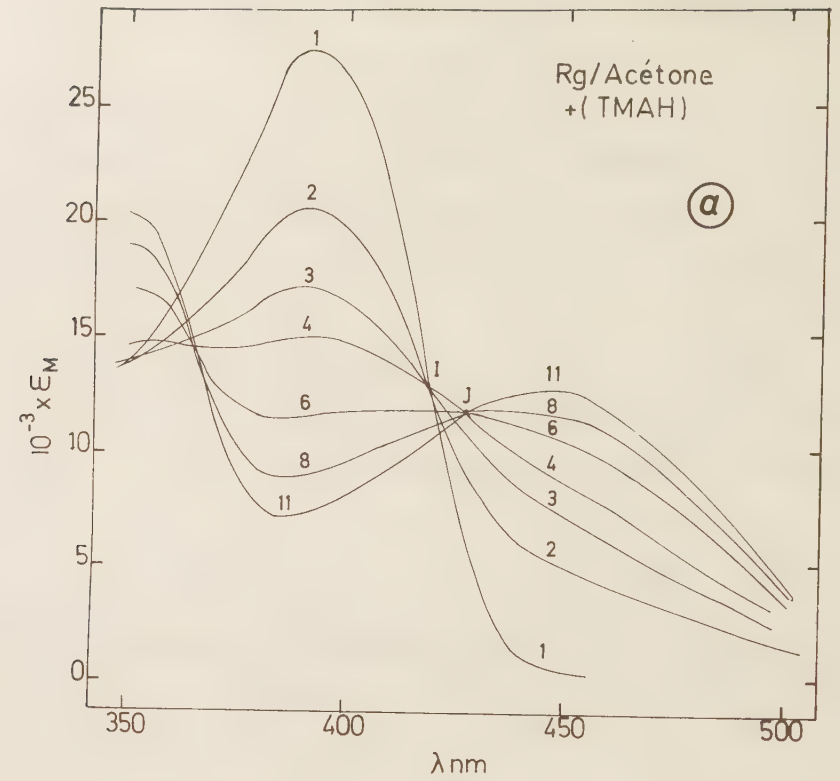


FIGURE 22 - TITRAGE DE Ls (milieu hydroalcoolique)



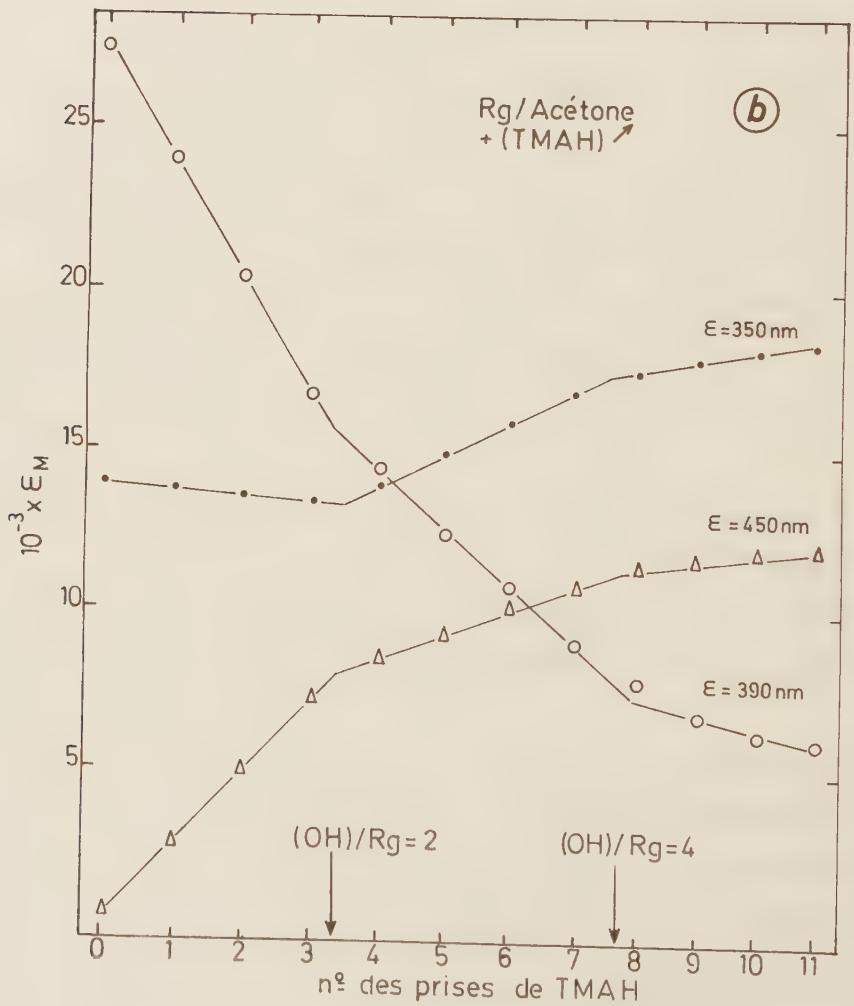


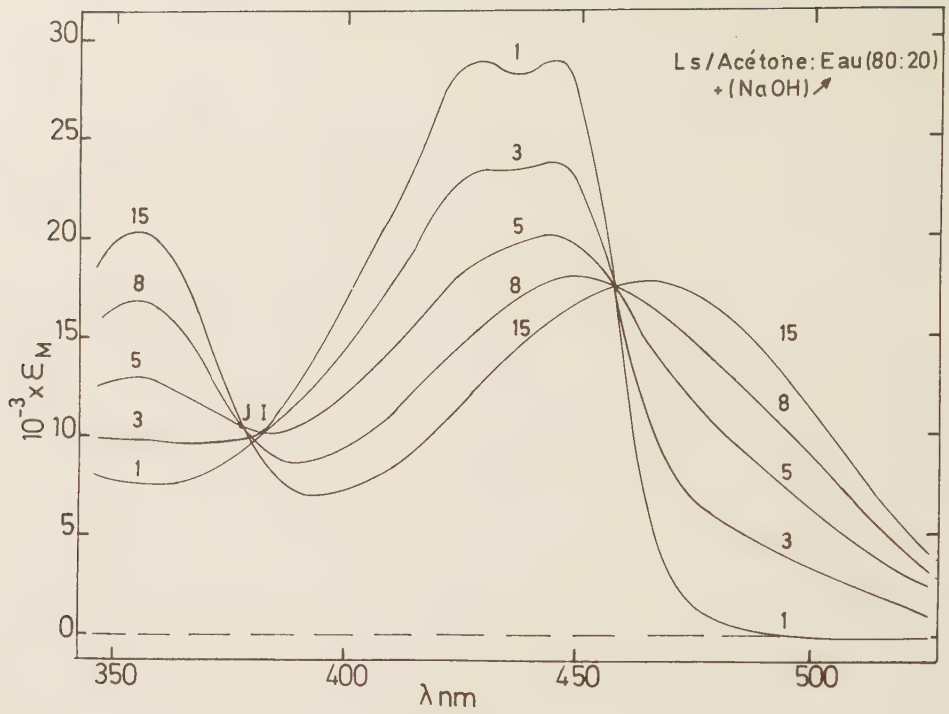
FIGURE 23 - TITRAGE DE Rg (milieu acétonique)

de deux puis des deux autres groupements phénoliques. Le pK_A de Rg , mesuré dans l'eau, représente donc en fait la moyenne de 2 pK_A très proches.

Il en est de même pour la Ls. La variation de l'absorbance de la lutéoskyrine dans un mélange (acétone-eau) (80:20) titrée par NaOH présente deux cassures (fig.24b) et les spectres correspondant montrent deux points isobestes (fig.24a) séparés dans la région de 380 nm. La mesure du pH dans ces conditions donne un pH apparent voisin de 10 pour un rapport OH/Ls proche de 5. Bien qu'indicative cette valeur apparente du pH (effet d'extension d'échelle d'acidité notamment) permet néanmoins de conclure que les deux fonctions titrées, relatives à 4-OH, correspondent bien aux 2 valeurs du pK_A de la lutéoslyrine.

Ces différents groupements (OH) ayant été titré séparément, il est maintenant intéressant d'en déterminer l'ordre d'acidité . Les OH en 8, 8' de Ls étant les plus basiques (pK_B), il reste à établir l'ordre d'acidité des $OH_{4\ 4'}$ et $OH_{5\ 5'}$ de Ls et Rg. Théoriquement, les OH énoliques sont plus acides que les OH phénoliques, les OH en 4, 4' seraient donc les plus acides. Mais, à cause de la conjugaison de la double liaison C_4-C_{11} avec la partie aromatique de la molécule, et en raison des liaisons hydrogènes intramoléculaires fortes (PHAM VAN CHUONG et al,1973)l'ordre normal d'acidité des OH pourrait être perturbé. La RMN du proton et du ^{13}C montre qu'il n'en est rien. En fait, nous avons observé (TOMA et al a) que 1) l'échange (proton-deutérium) le plus rapide est celui des OH en 4 4' . 2) Par addition progressive de pyridine deutérée à une solution acétonique deutérée de Ls , le pic $OH_{4\ 4'}$ s'élargit puis disparaît ; le pic $OH_{5\ 5'}$ s'élargit mais subsiste après disparition du pic $OH_{4\ 4'}$ alors que le pic $OH_{8\ 8'}$ reste inchangé tout au long du titrage. Ces résultats renseignent sur le degré de labilité des différents protons phénoliques.

En RMN du ^{13}C, les variations des déplacements chimiques des différents carbones, obtenues par additions successives de petites quantités de NaOD à une solution de Ls (ou Rg) dans le DMSO deutéré, permettent de confirmer l'ordre de basicité croissante $OH_{4-4'}$ $OH_{5-5'}$ $OH_{8-8'}$ (TOMA et al) .



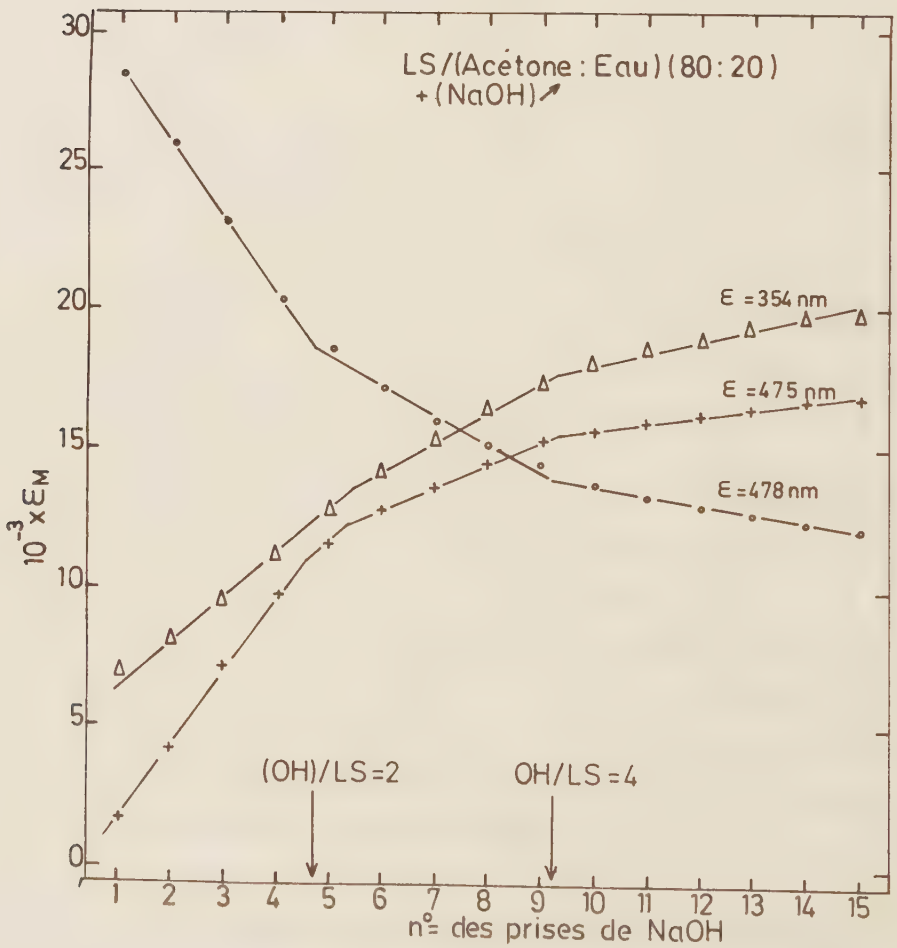


FIGURE 24 - TITRAGE DE Ls (milieu hydroacétonique)

2ème PARTIE

ETUDE DES COMPLEXES BINAIRES (PIGMENT-ION DIVALENT)

Les pigments (lutéoskyrine et rugulosine) ne s'associent aux acides nucléiques qu'en présence d'ions divalents tels que Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, ... En l'absence d'acides nucléiques ces pigments forment également des complexes avec ces différents ions. Pour mieux comprendre les modalités de formation des complexes ternaires : Pigment - Métal - Acide Nucléique il a paru souhaitable d'étudier en premier lieu les réactions d'interaction pigment - ion divalent.

Il faut remarquer que la lutéoskyrine et la rugulosine ne sont pas des cas d'exception. De nombreux composés synthétisés par les microorganismes pathogènes tels que l'acide kojique (DAVIES et al, 1950), l'acide fusarique (TAMARI, 1952), divers hydroxyanthraquinones (SUEMITSU, 1963) s'associent également aux ions divalents. D'autre part, la kanchanomycine (FRIEDMAN et al, 1969) , la chromomycine (NAYAK et al, 1973), la mithramycine (WARD et al 1965, KERSTEN et KERSTEN 1968) etc... nécessitent la présence d'ions divalents pour interagir avec les acides nucléiques.

2ème PARTIE - CHAPITRE I

ETUDE DES COMPLEXES (Ls + Mg) ET (Rg + Mg) EN MILIEU AQUEUX TAMPONNE.

-:-:-:-:-

1) Mise en évidence par absorption et dichroisme circulaire

Dans des tampons physiologiques ($6 < pH < 9$), la lutéoskyrine et la rugulosine se complexent aux ions divalents (Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+} ...). Ces complexes précipitent lentement sous forme d'agrégats jaunes. La formation de ces agrégats est accélérée par élévation de la température ou par augmentation de la concentration des constituants (pigments, ions). A titre d'exemple, pour une concentration de 0,035 mM en Ls et 0,1 mM en $MgCl_2$ à pH 7,2 et 21°C, les agrégats micellaires apparaissent au bout de 5 à 10 mn et ne sont bien formés qu'après 24 h à 30°C. La sédimentation complète peut alors être obtenue par centrifugation à 1000 g pendant 1 h. Les agrégats peuvent être remis en suspension par agitation. La sédimentation étant assez lente, il est alors possible de caractériser les complexes formés par spectrophotométrie d'absorption UV-visible et par dichroisme circulaire. Les spectres d'absorption (a) et de dichroisme circulaire (b) caractéristiques des complexes (Ls + Mg) et (Rg + Mg) à pH 7,4 sont représentés dans les figures 25 et 26 respectivement. L'inversion des spectres DC de Ls et Rg rend compte de l'isomérie optique de ces pigments. L'examen des spectres suggère que les complexes formés par l'un ou l'autre pigment avec les ions divalents sont de même nature. La formation de ces complexes se traduit par un dédoublement caractéristique de la bande d'absorption du visible et corrélativement en dichroisme circulaire par l'apparition de deux bandes très intenses et de signes opposés.

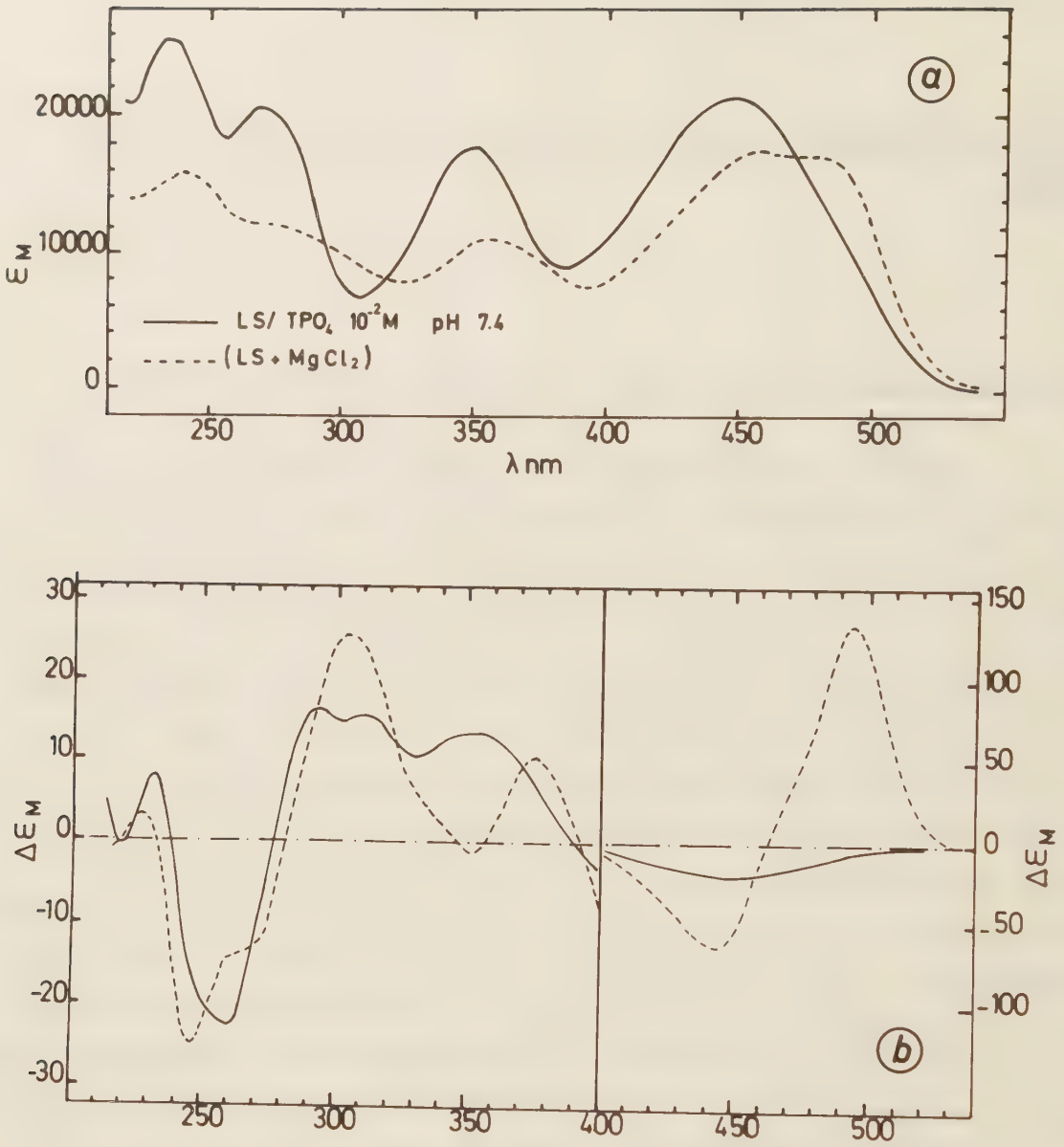


FIGURE 25 - SPECTRES D'ABSORPTION (a) ET DE DC (b)

——— de la lutéoskyrine (Ls) en solution dans le tampon phosphate de sodium (0,01 M) ; pH 7,4.

----- du complexe (Ls + Mg^{2+}), Mg/Ls = 3 ou 20 dans le même tampon. Les spectres sont obtenus après incubation du mélange à 30°C pendant 24 h. et après homogénéisation par agitation des agrégats micellaires de complexe.

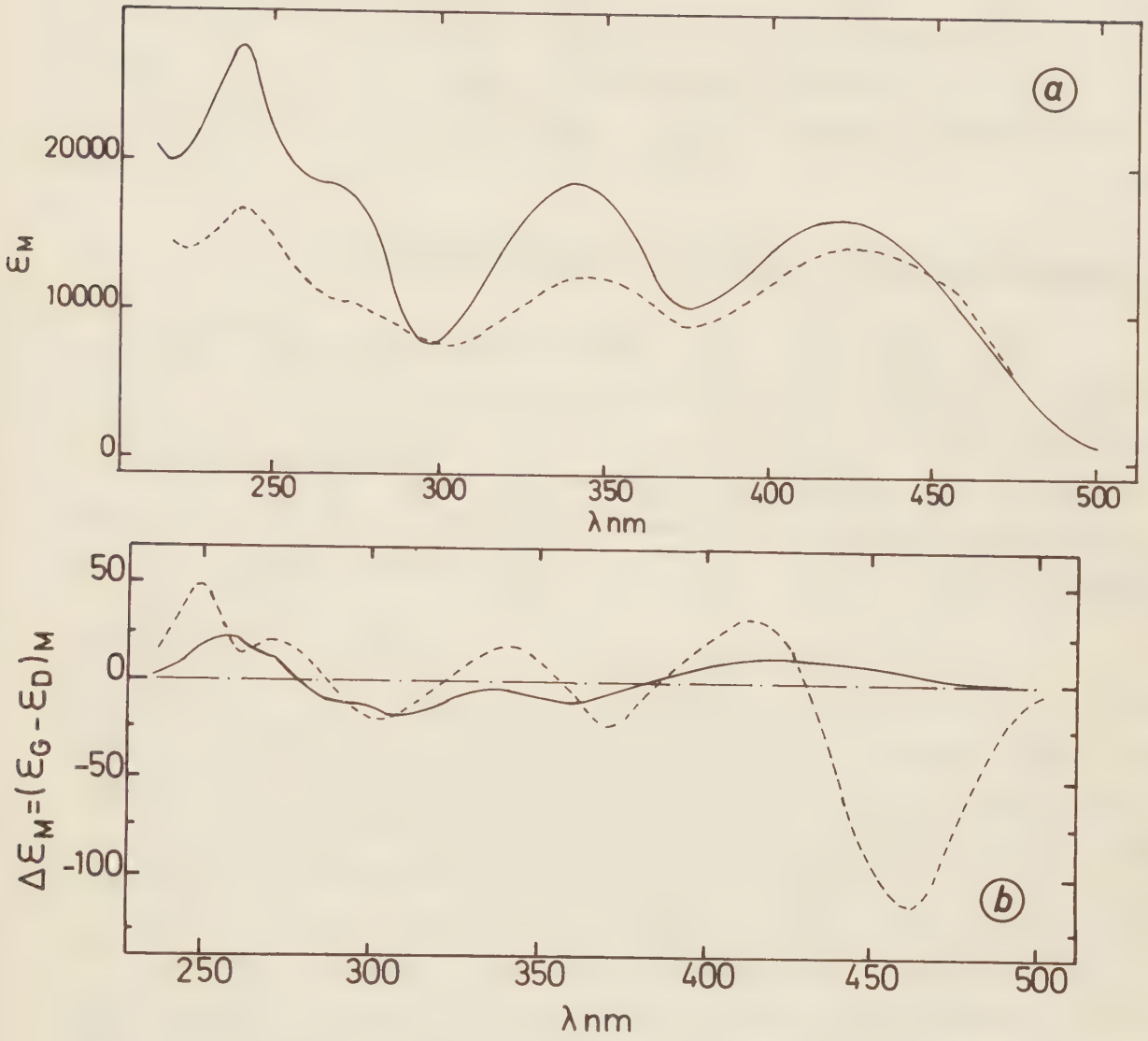


FIGURE 26 - SPECTRE D'ABSORPTION (a) ET DE DC (b)

——— de la rugulosine (Rg) en solution dans le tampon phosphate de sodium (0,01 M) ; pH 7,4.

----- du complexe (Rg + Mg^{2+}), Mg/Rg = 3 ou 20 dans le même tampon. Spectres après incubation (30°C, 24 h) et agitation du mélange.

Comme la rugulosine ne possède pas d'OH en 8-8', ces résultats impliquent une participation possible des OH en 4 4' ou 5 5' dans la formation des complexes (pigment - ion). L'étude des complexes en fonction du pH permet encore de préciser ce point.

2) Influence du pH sur la formation des complexes

Mode opératoire : Une même quantité d'ions Mg^{2+} ($MgCl_2$) est ajoutée à une série de tubes contenant des solutions de pigments (Mg/pigment = 10) à divers pH . Ces solutions sont incubées 24 h à 37°C. Les agrégats précipités sont remis en suspension par agitation vigoureuse (Vortex). La mesure du pH et l'enregistrement des spectres sont effectués immédiatement après.

Les mesures effectuées sur des suspensions n'étant pas absolues, nous avons représenté dans la figure 27 les variations des rapports de DC (a) ou d'absorption (b) à deux longueurs d'onde du même spectre. Les variations du rapport d'anisotropie $\Delta\varepsilon/\varepsilon$ (c et d) (KUHN 1930, LOWRY et FRENCH 1932) donnent les mêmes résultats. D'après ces résultats, le domaine pH de stabilité des complexes Ls - Mg et Rg - Mg est $7 < pH < 10$. On observe pour $pH > 11$, un précipité blanc de $Mg(OH)_2$ et pour $pH < 5,0$, un précipité jaune de pigments sous forme protonée. Dans la zone de pH 7 à 10 nous savons (1ère partie) que les OH 4-4' et 5-5' sont déprotonés. Ces groupements phénates ainsi que les carbonyles en 10-10', sont donc des sites possibles pour la fixation du Mg^{2+}. Une étude de stoechiométrie fournira les rapports des constituants mis en jeu permettant de préciser la structure du complexe et les sites de fixation des ions.

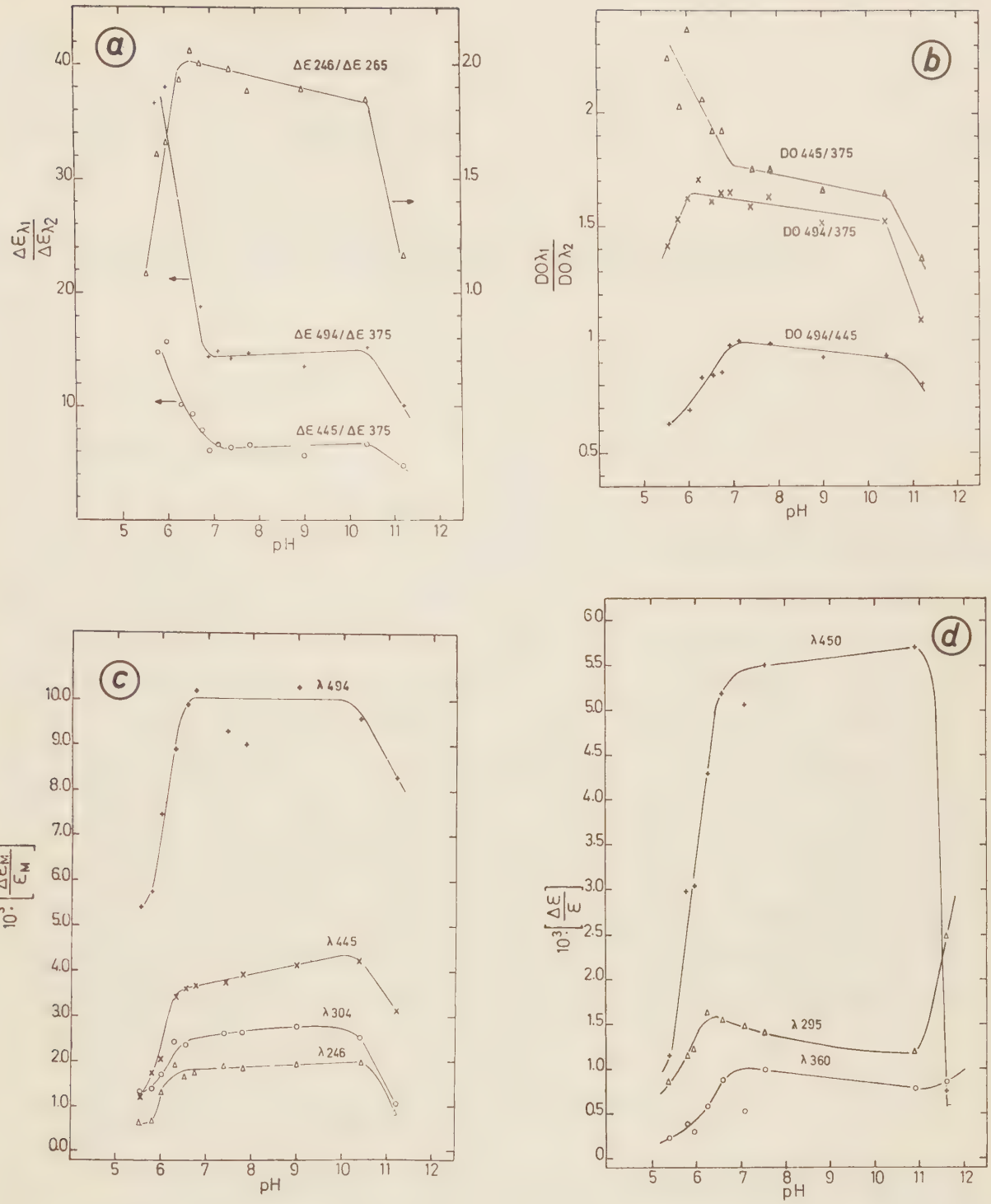


FIGURE 27 - STABILITE EN FONCTION DU pH DES COMPLEXES :
a, b, c : (Ls + $MgCl_2$) d : (Rg + $MgCl_2$).

Les mélanges (pigment + $MgCl_2$) pigment/Mg = 20 en solution tamponnée à divers pH sont incubés à 37°C pendant 24 h. Après homogénéisation par agitation (Vortex), on mesure le pH (Tacussel, ISIS 4000) et on enregistre les spectres d'absorption (Cary 14) et de DC (Jouan, dichrographe II).

2ème PARTIE - CHAPITRE II

STOECHIOMETRIE DES COMPLEXES (Ls + Mg) et (Rg + Mg)

-:-:-:-:-

1) Choix du solvant

Les complexes (pigment - ion divalent) précipitent en milieu aqueux. Nous avons cherché des milieux organiques où ces complexes restent solubles rendant possible une détermination des stoechiométries par des études spectrophotométriques. Nous avons pu obtenir des spectres analogues à ceux des figures 25 et 26 pour des mélanges (Ls + Mg^{2+}) et (Rg + Mg^{2+}) dans le DMSO, le mélange DMSO - eau (70-30), la pyridine, les mélanges acétone - eau et éthanol - eau (différents pourcentages d' eau). Dans le DMSO et la pyridine, les complexes se forment difficilement sans doute en raison des associations (ion - solvant). Dans les mélanges hydroalcooliques, les complexes sont bien formés mais précipitent pour des concentrations élevées en pigment. Le meilleur solvant est le mélange (acétone-eau) dont le pourcentage d'eau peut varier de 2 à 20 % en volume.

2) Etude dans l'acétone aqueux (2 % d'eau)

Les spectres d'absorption et de dichroisme circulaire de Ls et Rg à l'état neutre en solution dans l'acétone (ou l'acétone aqueux) ne sont pas modifiés par addition de $MgCl_2$. Dans ces conditions, il n'y a pas formation de complexe. Par contre, lorsque l'on déprotone d'abord les pigments (tel que NaOH/pigment = 4 à 7), l'addition de $MgCl_2$ donne lieu à une formation immédiate de complexe comme l'indiquent les spectres d'absorption et de DC. En fonction du temps, ces spectres évoluent lentement vers une forme limite atteinte au bout d'une durée variant de 10 h à 60 h

(à 20°C) selon la concentration en pigment (Fig.28). Pour déterminer la stoechiométrie des complexes, nous avons donc suivi, pour des concentrations croissantes en $MgCl_2$, les variations des spectres d'absorption visible et de DC, à l'instant t_o, c'est-à-dire juste après l'addition d'ions Mg^{2+}, et à l'instant final, c'est à-dire après 5 jours (à 20°C). Le milieu utilisé était un mélange (acétone : eau) (98 : 2), la concentration en pigment étant de 0,035 mM, le rapport (NaOH)/(Pigment) égal à 4 et le rapport $(MgCl_2)$/(Pigment) variant de 0 à 25.

a) Mesures à l'instant initial t_o

Dans les conditions précisées ci-dessus, les spectres optiques des complexes formés au moment de l'addition d'ions Mg^{2+} (désigné par complexes M) ne varient pratiquement pas au cours des 20-25 premières minutes. La durée d'enregistrement des spectres (de 560 nm à 320 nm) étant de 5 mn en absorption et de 15 mn en DC, les solutions étant d'autre part distinctes pour les deux techniques, les spectres sont obtenus dans un délai minimum après addition de $MgCl_2$ et peuvent être considérés comme caractéristiques des complexes M.

Les figures 29 et 30 montrent l'allure des spectres d'absorption (a) et de DC (b) des complexes (Ls + Mg) (Fig. 29 et (Rg + Mg) (Fig. 30). On remarque que la bande d'absorption du visible de Ls et Rg subit un effet hypsochrome et hyperchrome.

Les figures 31 (Ls) et 32 (Rg) représentent les variations du coefficient d'extinction molaire ε_M (a) et du coefficient d'extinction molaire différentielle (b) $\Delta\varepsilon_M = (\varepsilon_G - \varepsilon_D)_M$ à des longueurs d'onde caractéristiques (variations maximales et points isobestes) en fonction du rapport r = Mg/Pigment (méthode du rapport molaire, HARVEY et al 1950).

Les ruptures de pente des courbes des figures définissent au moins 3 états d'équilibre successifs .

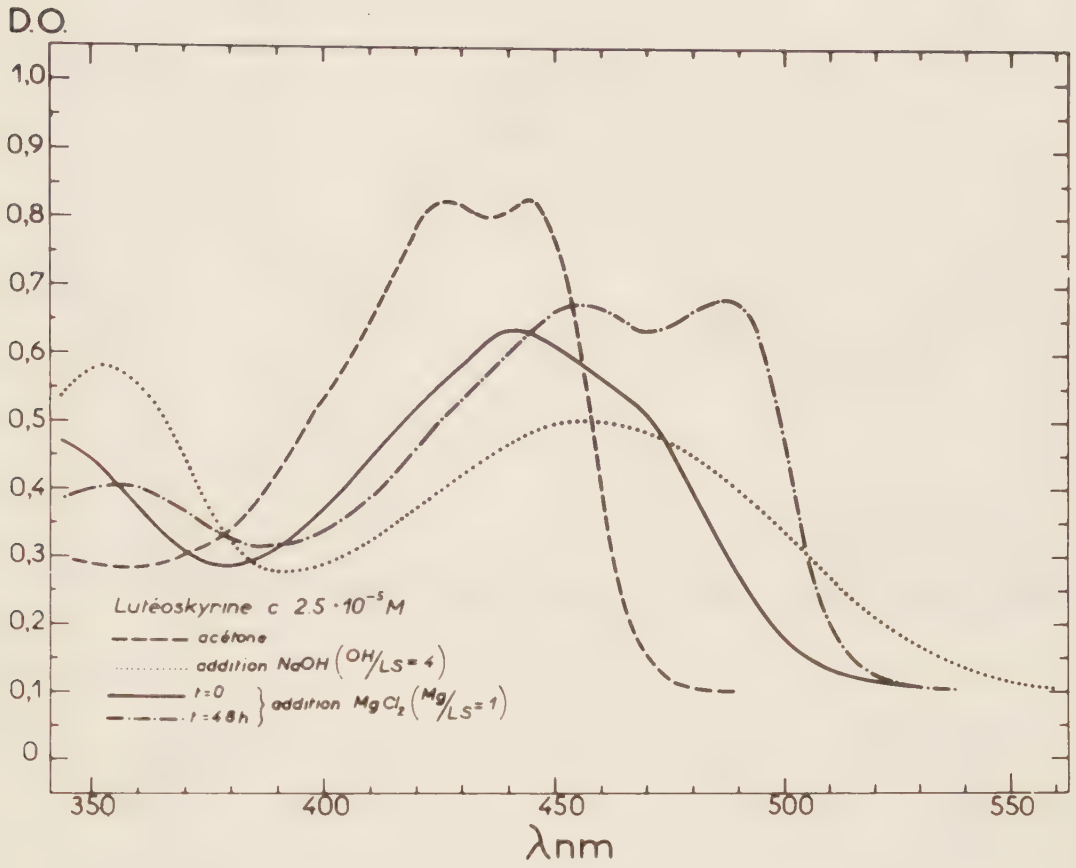


FIGURE 28 - COMPARAISON DES SPECTRES D'ABSORPTION des solutions dans l'acétone aqueux (2% d'eau) de :

----- Ls neutre

..... Ls basique

——— Ls complexée aux ions Mg^{2+} (OH/Ls = 4, Mg/Ls = 1) à l'instant initial t_o

-.-.- après 48 h d'incubation à 37°C

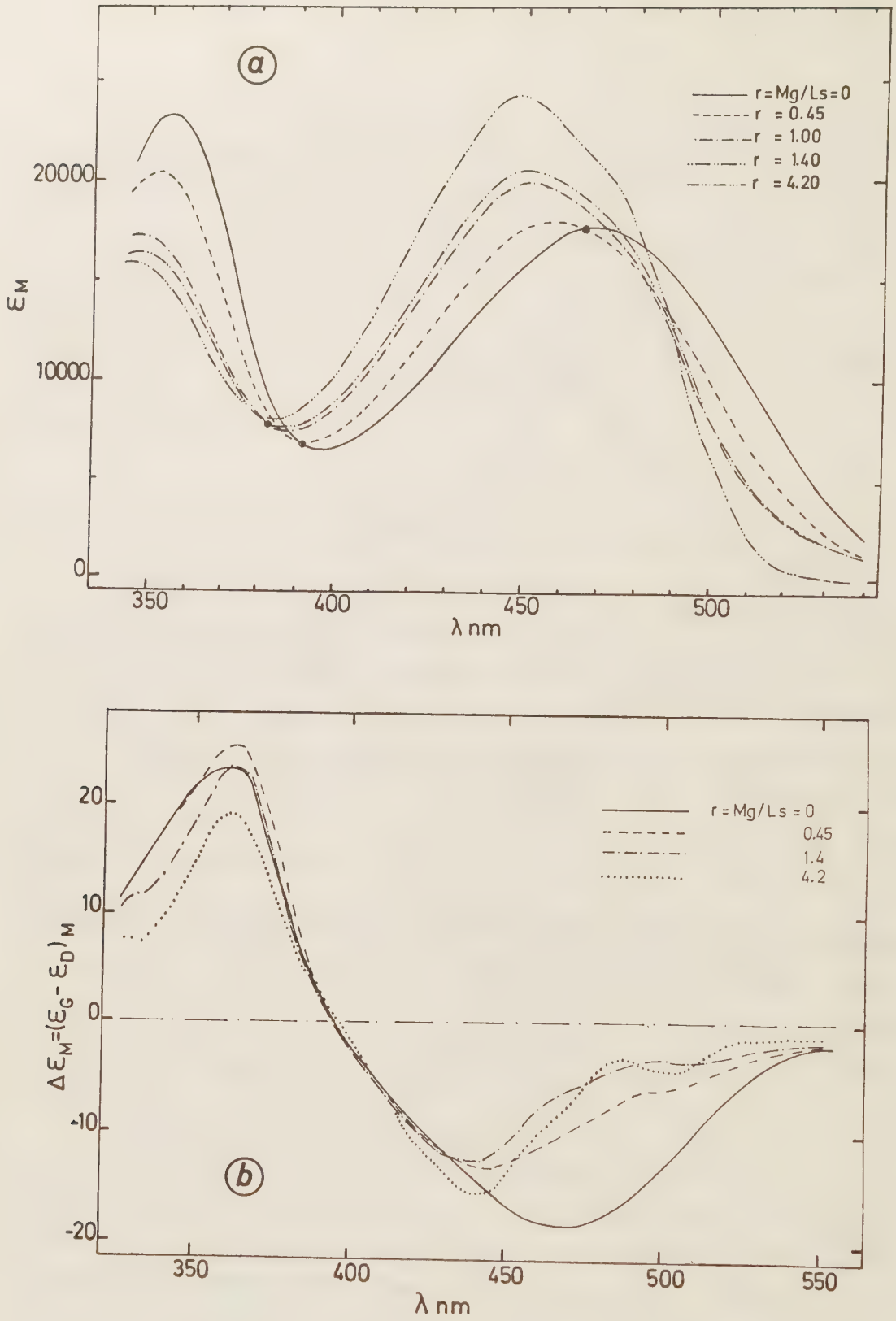


FIGURE 29 - SPECTRES D'ABSORPTION (a) ET DE DC (b) A L'INSTANT INITIAL DES MELANGES (Ls + Mg) - (complexes M) -

Les spectres sont enregistrés immédiatement après addition de $MgCl_2$ (0,035 mM) à des solutions de lutéoskyrine (C_{Ls} = 0,035 mM) dans l'acétone aqueux basique (2% d'eau NaOH/Ls=4)

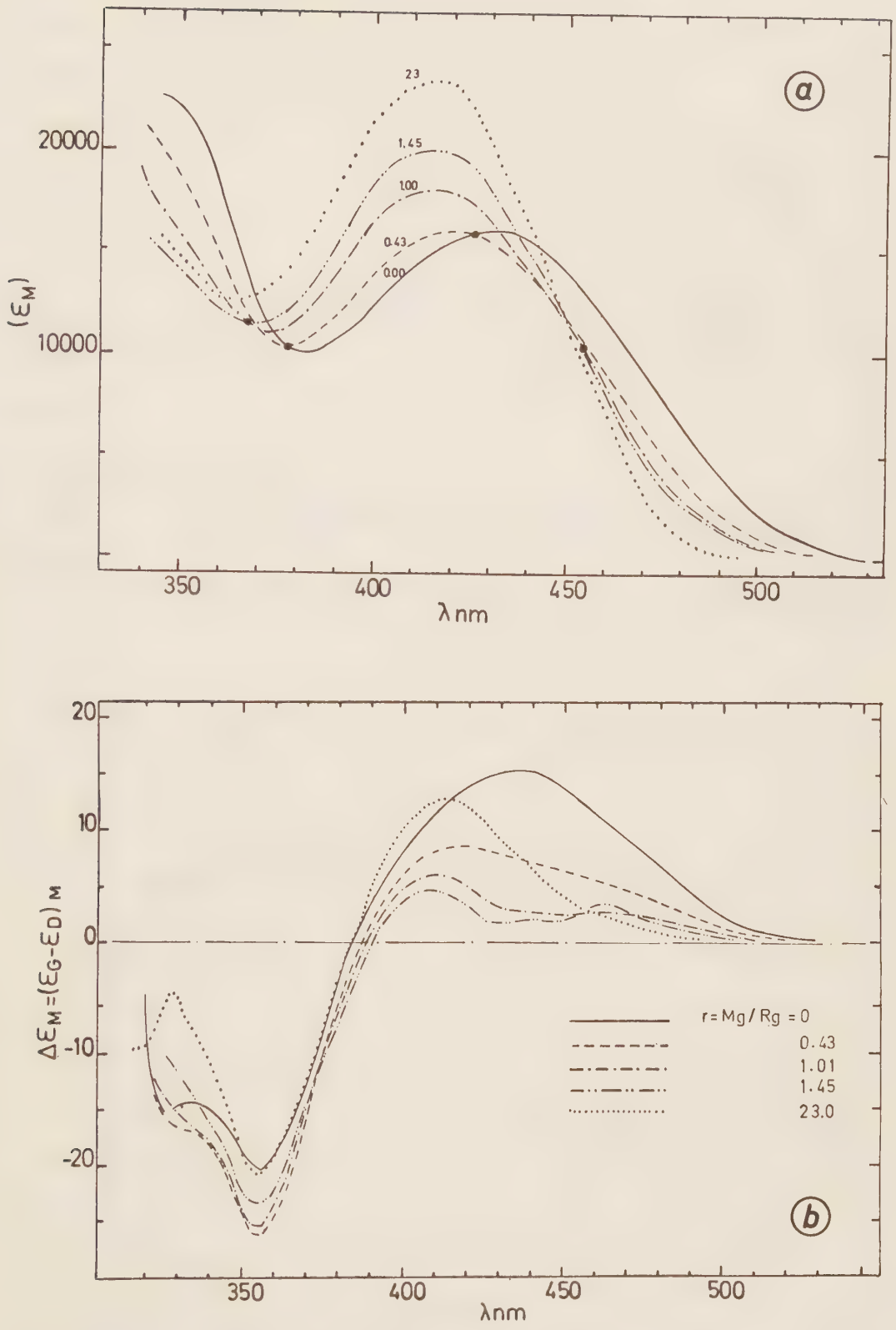


FIGURE 30 - SPECTRES D'ABSORPTION (a) ET DE DC (b) A L'INSTANT INITIAL DES MELANGES (Rg + Mg) - (complexes M) -

(Conditions expérimentales identiques à celles de la Fig.29)

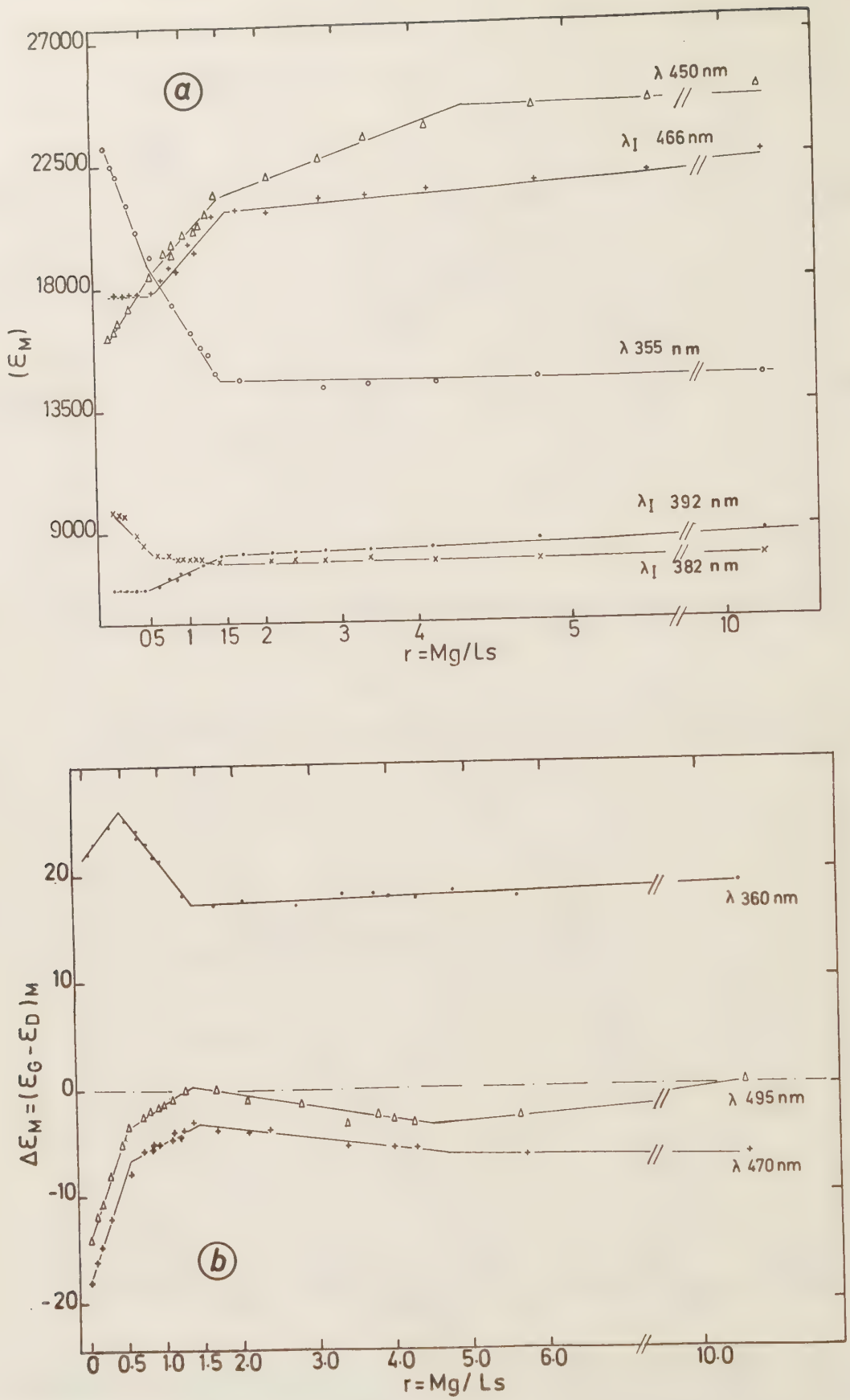


FIGURE 31 - STOECHIOMETRIE DES COMPLEXES M DE (Ls + Mg)

Variations des coefficients molaires ε_M (a) et $\Delta\varepsilon_M$ (b) à différentes longueurs d'onde (λ_I = longueur d'onde correspondant à un point isobeste).

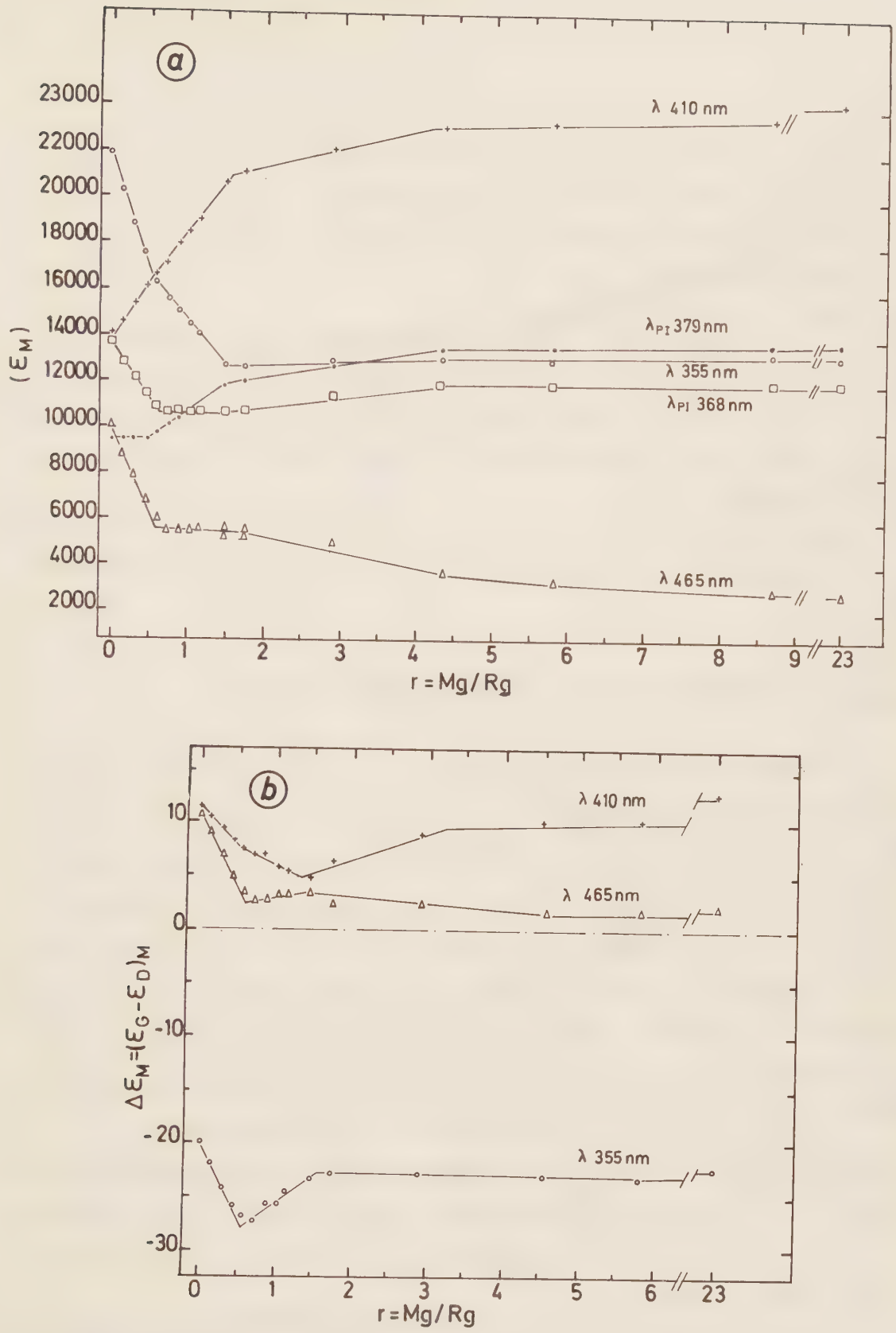


FIGURE 32 - STOECHIOMETRIE DES COMPLEXES M DE (Rg + Mg)
par spectrophotométrie d'absorption (a) et de DC (b).

Pour $0 < r < 0,5$ il y a équilibre entre la forme libre du pigment et le complexe ML_2 (1 magnésium/ 2 ligands) comme le montre l'existence en absorption de points isobestes (à 392 et 466 nm pour la Ls, à 379 et 425 nm pour la Rg) également situés sur la courbe $r = 0$.

Pour $0,5 < r < 1,5$ l'équilibre entre les complexes ML_2 et M_3L_2 est mis en évidence par l'existence de points isobestes à 382 nm (Ls), à 368 et 455 nm (Rg) non situés sur le spectre du pigment libre; l'équilibre avec la forme libre du pigment semble donc exclu.

Pour $r > 1,5$ on n'observe pas de points isobestes définis et la présence d'un complexe (vers $r = 4,5$) est moins évidente.

b) Mesures à l'instant final (après 5 jours à 20°C)

En fonction du temps les spectres des complexes (M) de Ls évoluent vers des formes limites caractéristiques atteintes au bout d'environ 60 h à 20°C. Les spectres d'absorption et de DC de ces nouveaux complexes sont représentés dans les figures 33 et 34 (Ls), 35 et 36 (Rg). En absorption, on observe un dédoublement de la bande du visible et un effet hyperchrome par rapport au spectre du pigment isolé. En dichroisme circulaire, le dédoublement se traduit par l'apparition de deux bandes dichroiques caractéristiques. L'analyse détaillée de ces spectres par la théorie excitonique sera discutée ultérieurement (Chapitre III)

Dans le cas de la lutéoskyrine, les variations des coefficients ε_M et $\Delta\varepsilon_M$ en fonction de r , représentées dans la figure 37 mettent en évidence l'existence de deux complexes pour $r \simeq 1$ et $r \simeq 3$. La présence d'un troisième complexe pour $r > 5$ est plus aléatoire.

Dans le cas de la rugulosine, le phénomène observé est analogue à celui de la Ls. Les variations des coefficients ε_M et $\Delta\varepsilon_M$ (Fig. 38) révèlent l'existence de deux complexes de stoéchiométrie voisine de 0,8 et 3 et d'un troisième complexe, moins évident, pour $r \simeq 6$. La stoéchiométrie apparente de 0,8, et non de 1,0 comme pour Ls, est dûe en fait à une réaction incomplète :

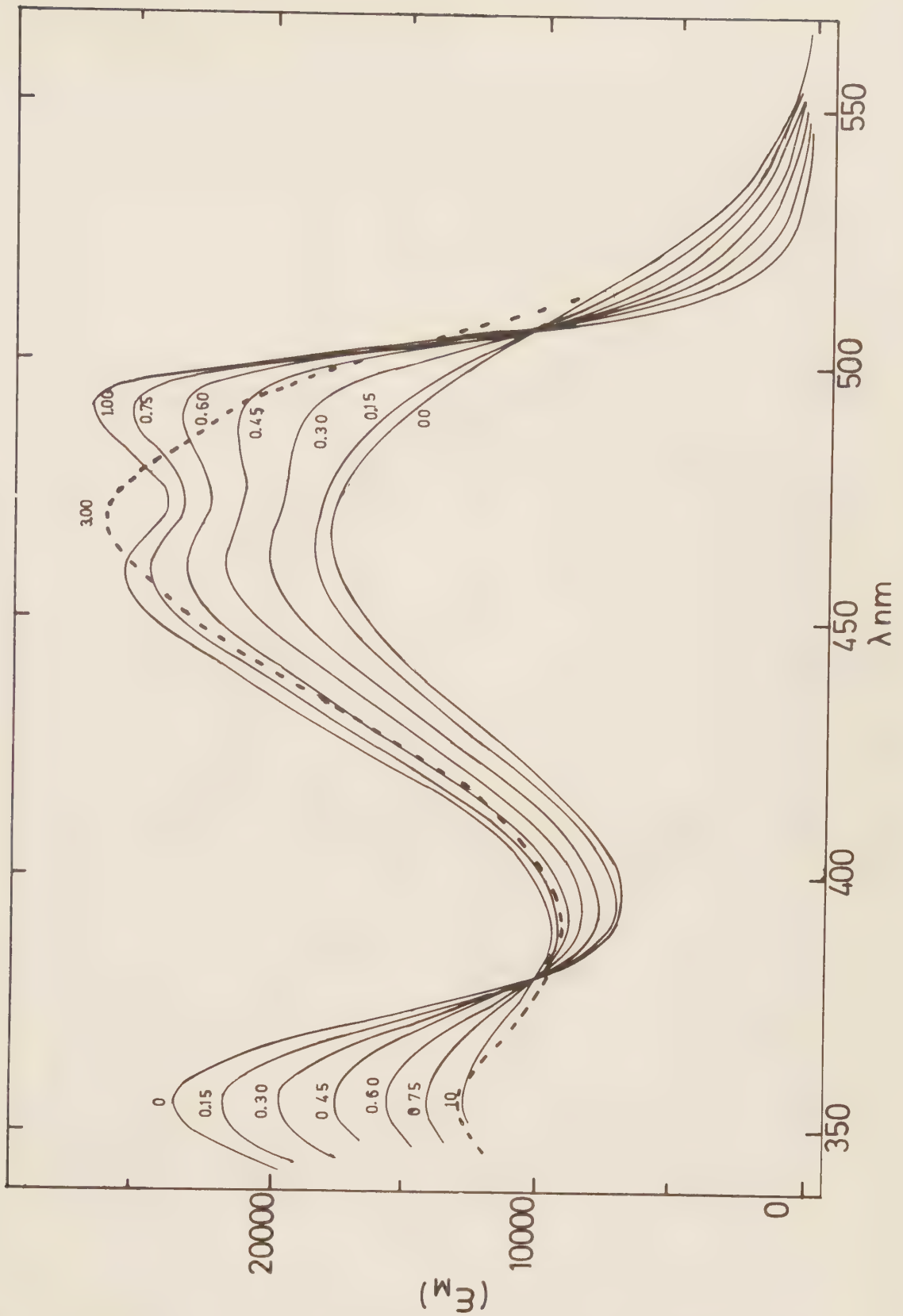


FIGURE 33 - SPECTRES D'ABSORPTION DES COMPLEXES P DE (Ls + Mg)

Les spectres sont enregistrés pour différentes valeurs du rapport r = Mg/Ls (indiqués sur les courbes) des solutions de (Ls + Mg) (conditions identiques à celles de la figure 29), après incubation à 20°C pendant 5 jours).

Pour r = 1, le spectre est caractéristique du complexe P_1.

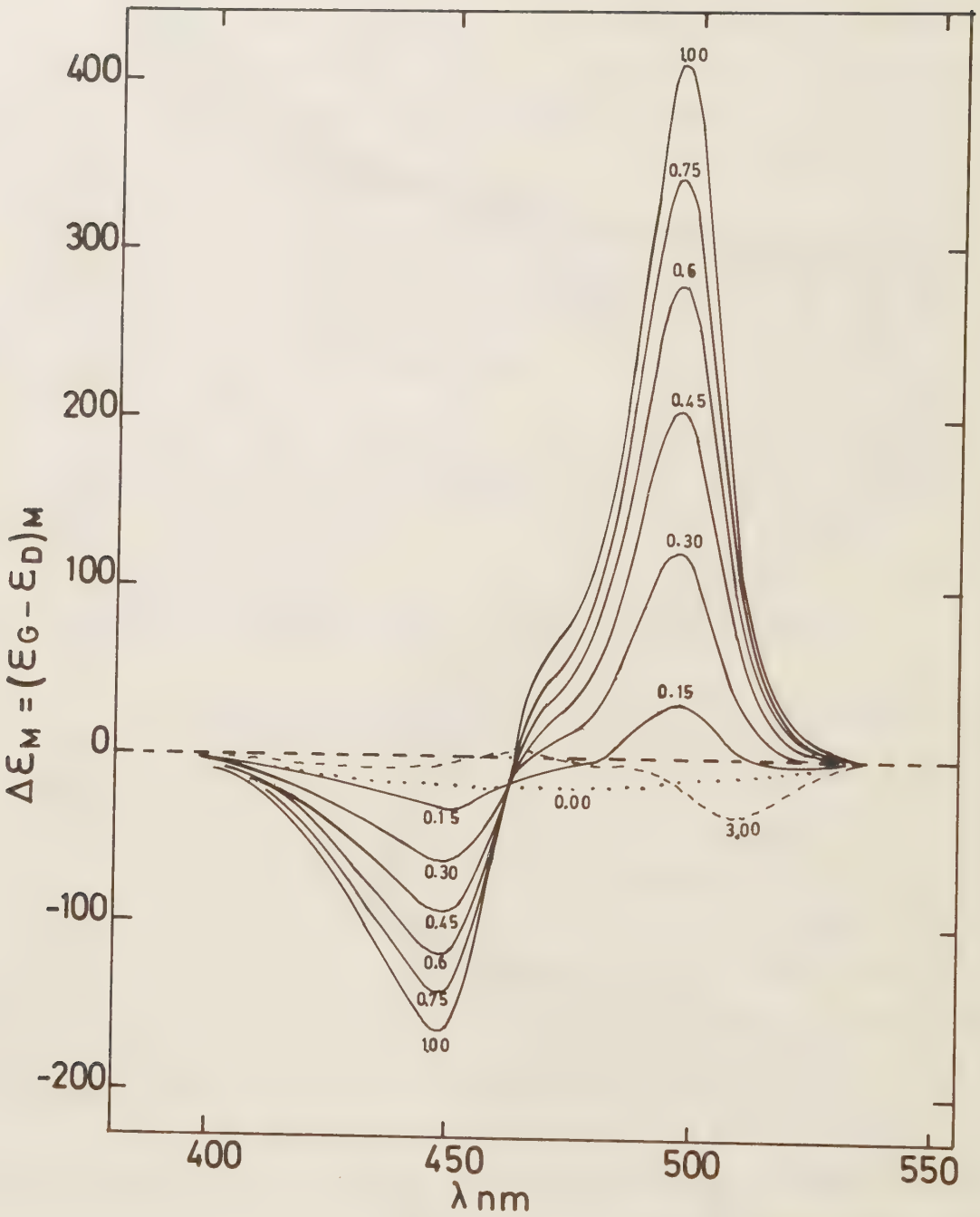


FIGURE 34 - SPECTRES DE DICHROISME CIRCULAIRE DES COMPLEXES P DE (Ls + Mg) POUR DIFFERENTS RAPPORTS r = Mg/Ls.

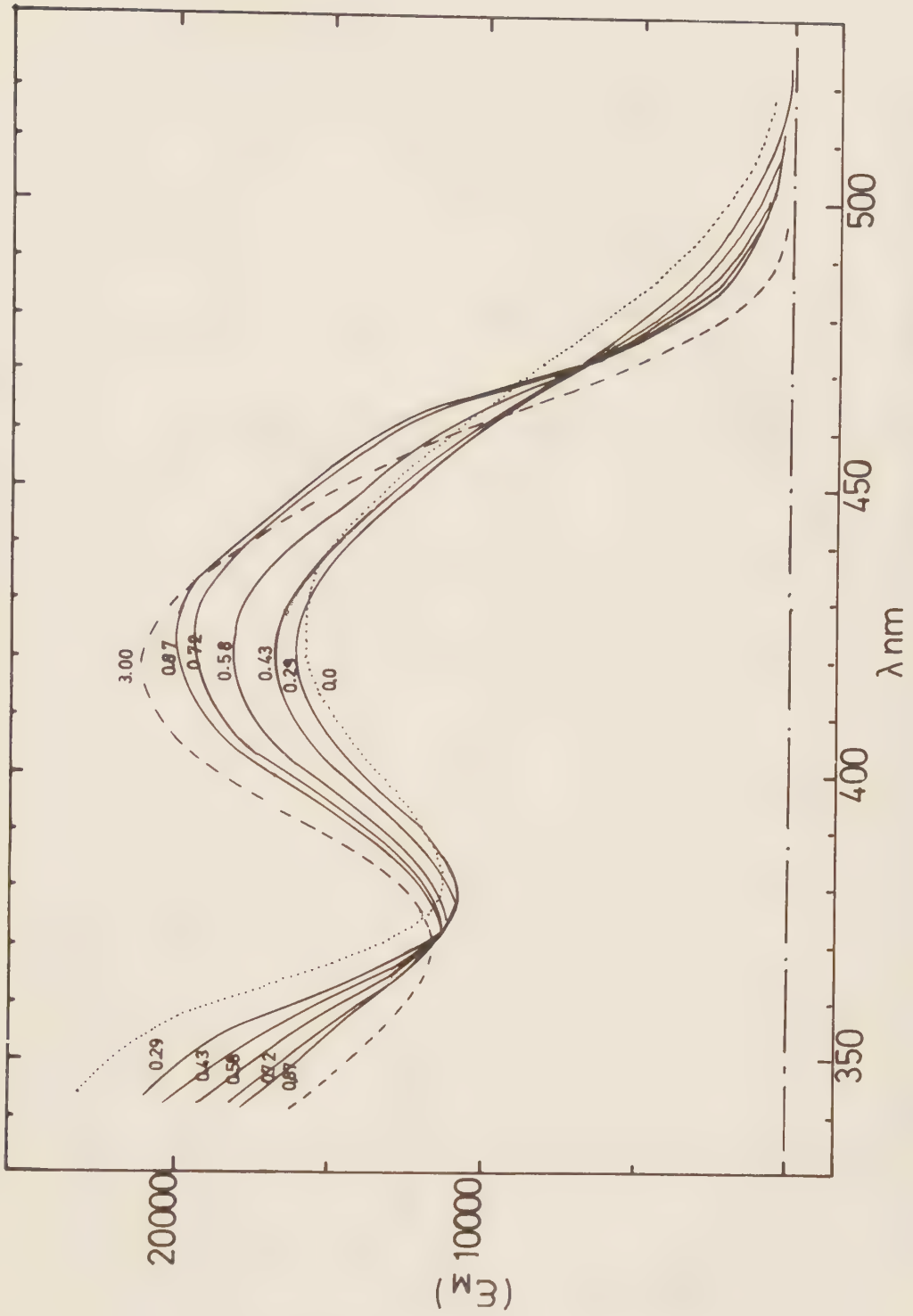


FIGURE 35 - SPECTRES D'ABSORPTION VISIBLE DES COMPLEXES P DE (Rg + Mg).

Les solutions de (Rg + Mg), dans les conditions expérimentales précisées dans la figure 30, ont été incubées à 20°C pendant 5 jours.

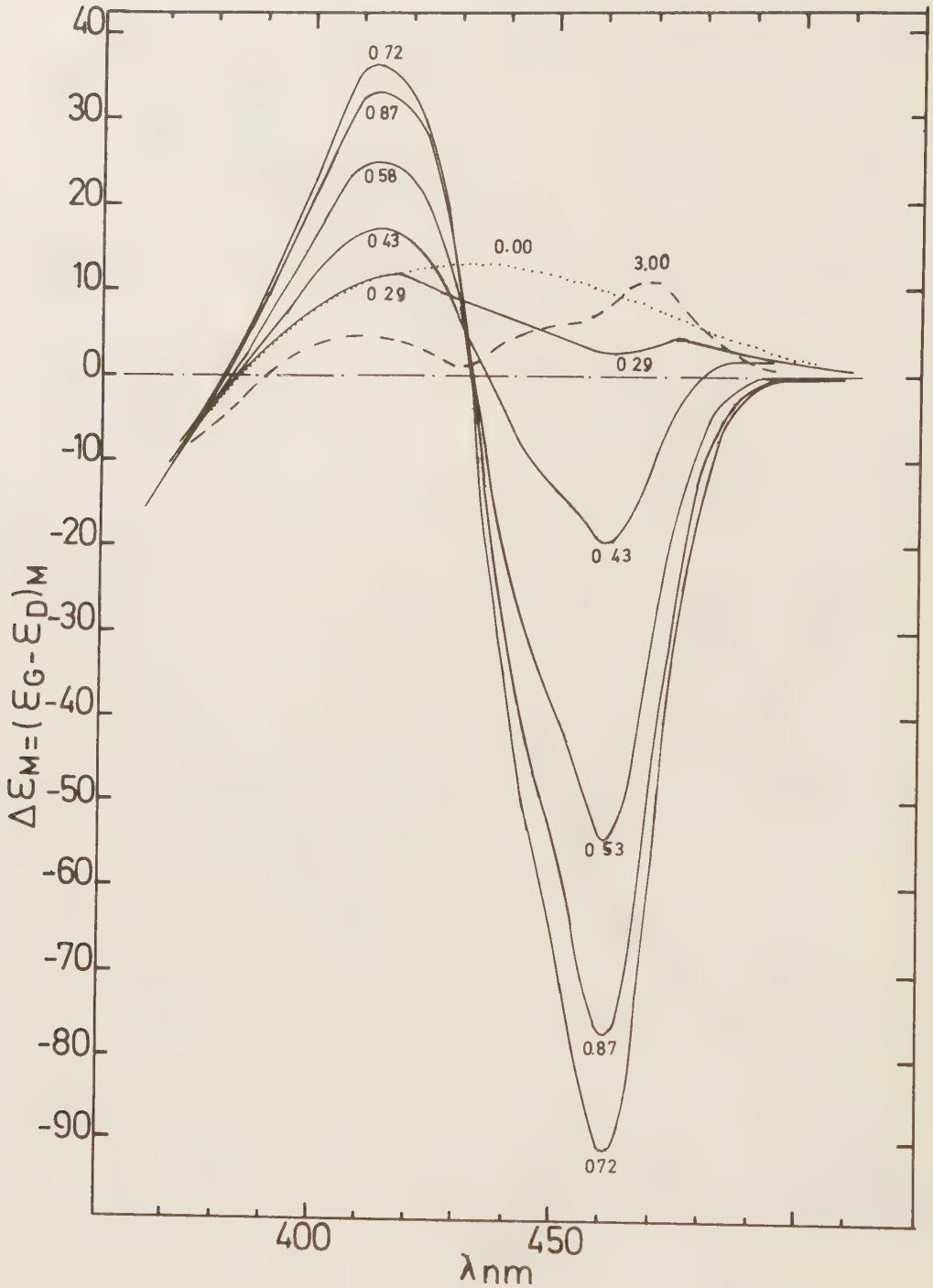


FIGURE 36 - SPECTRES DE DICHROISME CIRCULAIRE DES COMPLEXES P DE (Rg + Mg)
(voir légende de la figure 35).

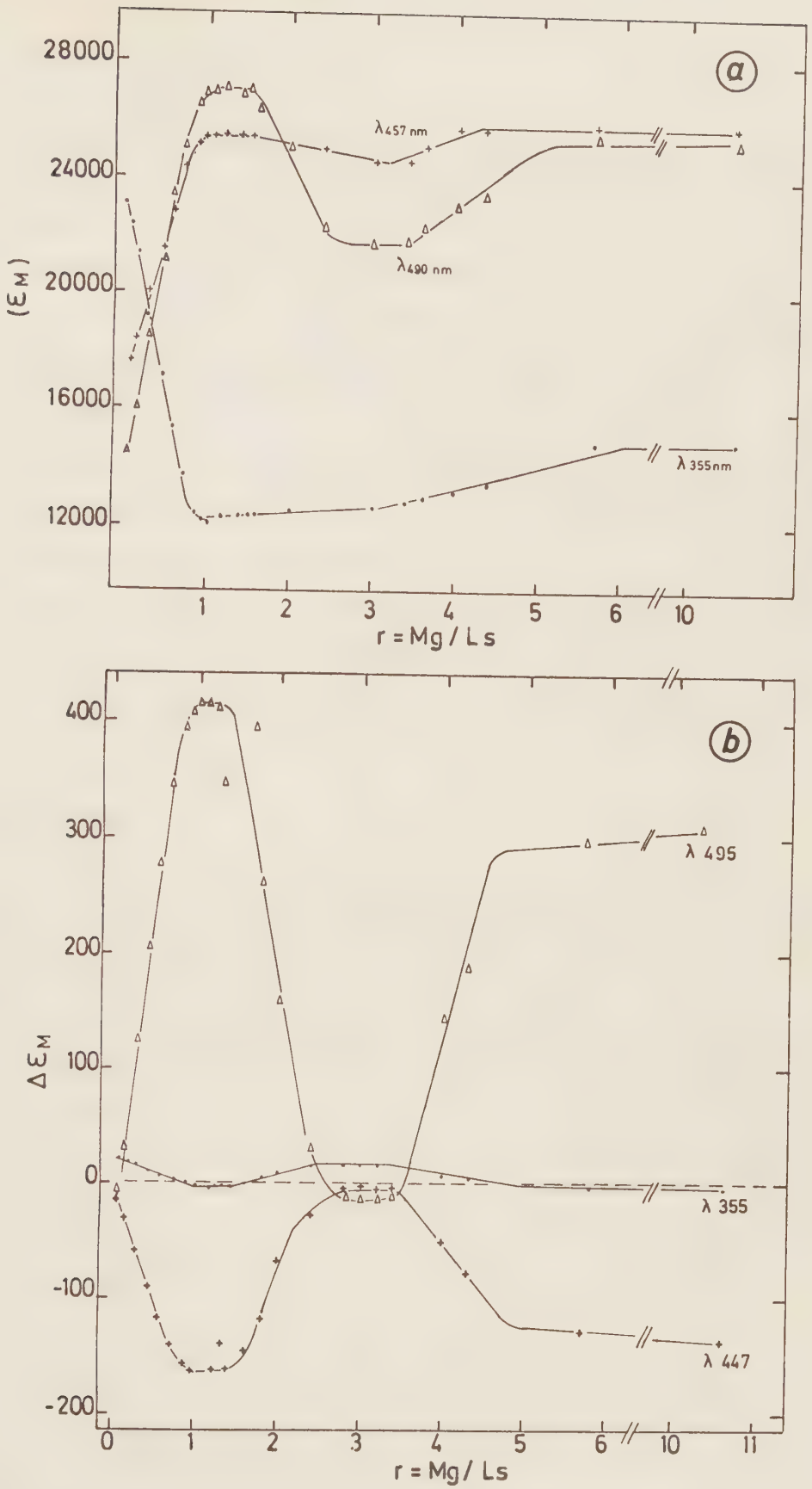


FIGURE 37 - STOECHIOMETRIE DES COMPLEXES P DE (Ls + Mg) - après 5 jours à 20°C - par spectrophotométrie d'absorption (a) et de DC (b).

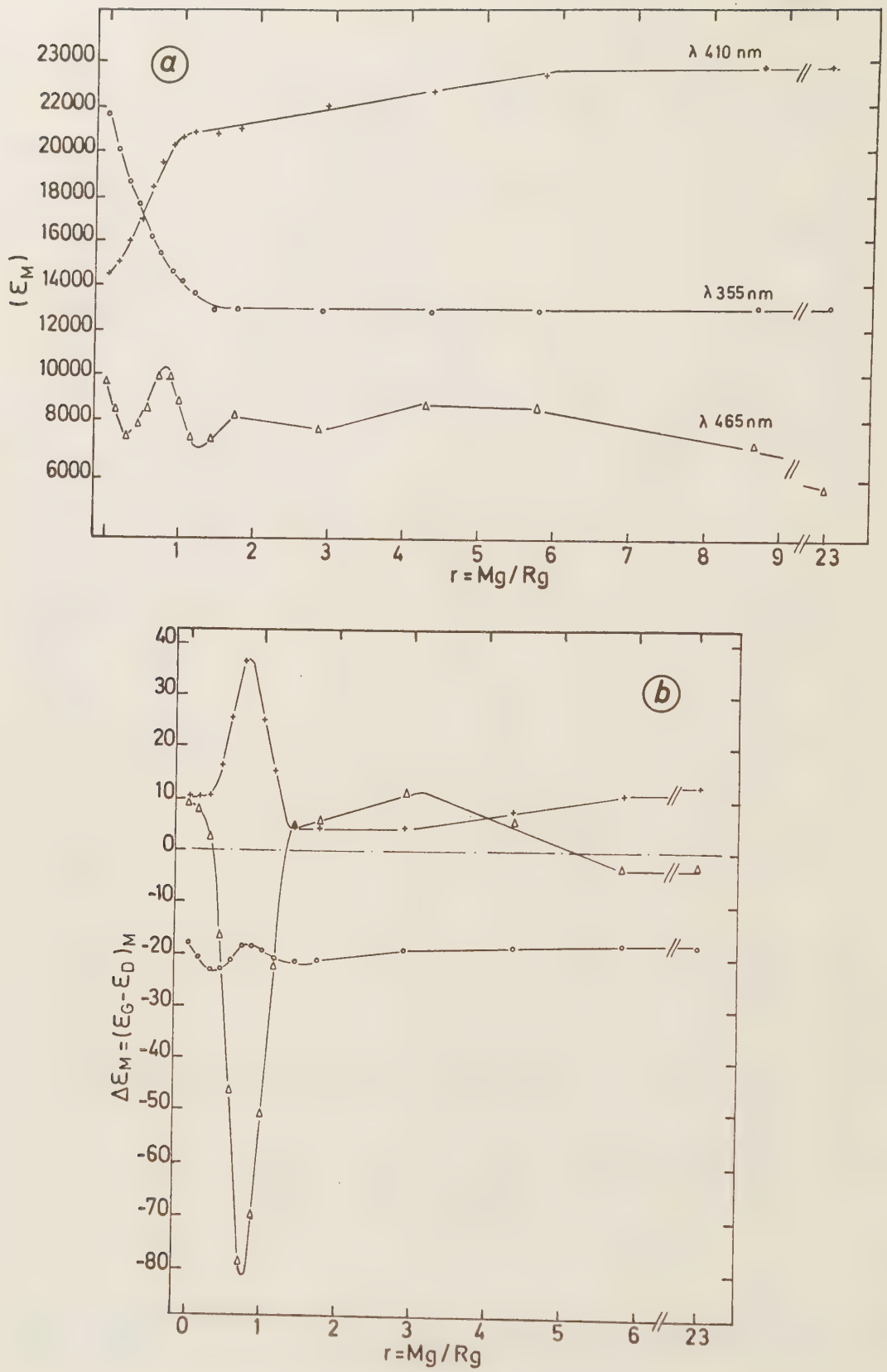


FIGURE 38 - STOECHIOMETRIE DES COMPLEXES P DE (Rg + Mg) - après 5 jours à 20°C - par spectrophotométrie d'absorption (a) et de DC (b).

Les mesures sont effectuées aux mêmes longueurs d'onde en absorption et en DC.

en effet, le coefficient $\Delta\varepsilon$ molaire caractéristique du complexe Pigment/Métal = 1 (désigné par complexe P_1), atteint sa valeur maximum (-280) à la longueur d'onde 465 nm pour la stoéchiométrie de 1 après 7 jours à 25°C. D'autre part, contrairement à la Ls, il n'y a ni linéarité des variations de ε_M et $\Delta\varepsilon_M$, ni point isobeste pour $r < 0,5$ (Fig. 36 et 38). De plus, la variation de ε_M à 465 nm révèle la persistance après 5 jours à 20°C, des deux complexes M initiaux (r = 0,5 et r = 1,5).

Les résultats relatifs à (Ls + Mg) et (Rg + Mg) compte tenu de ces observations, suggèrent que le complexe P_1 final (r = 1) résulte de la transformation complète des complexes initiaux. Dans ce cas la présence de points isobestes sur les spectres d'absorption et de DC de la lutéoskyrine pour $r < 1$ traduirait l'existence de deux formes (libre et complexe P_1) non en équilibre ayant les mêmes valeurs de ε_m ou de $\Delta\varepsilon_m$.

c) Interprétation

Pour expliquer les stoéchiométries successives à l'instant initial, et celle à r = 1 après 5 jours, nous proposons l'hypothèse de la formation d'un polychélate.

La stoéchiométrie de 0,5 est satisfaite par la fixation sur une molécule de pigment d'un ion Mg^{2+} auquel s'associe immédiatement une autre molécule de pigment. A chaque extrémité libre du dimère de pigment ainsi formé se fixerait un ion supplémentaire donnant une stoéchiométrie de 3/2. A chacun de ces ions vient s'associer une molécule de pigment, allongeant ainsi la chaîne selon le schéma

$$M + 2L \rightleftharpoons M L_2$$
$$ML_2 + 2M \rightleftharpoons M_3L_2$$
$$M_3L_2 + 2L \rightleftharpoons M_3L_4$$
$$M_3L_4 + 2M \rightleftharpoons M_5L_4$$
$$\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots$$
$$M_{2n-1}L_{2n} + 2M \rightleftharpoons M_{2n+1}L_{2n}$$

Le phénomène se poursuit donc par la formation alternée de complexes successifs de stoéchiométries ($M_{2n-1}L_{2n}$) et ($M_{2n+1}L_{2n}$). Lorsque n croit, (M)/(L) tend vers 1. Le complexe P_1 (r=1) est alors un polychélate. Par contre, la stoéchiométrie de 3 (au temps 5 jours) correspond probablement à des complexes monomériques dans lesquels les ions Mg^{2+} saturent les sites de fixation du pigment : un ion Mg^{2+} se liant par exemple aux groupements $O_4^{(-)}$, $O_{4'}^{(-)}$, $C = O_{10}$ et $C = O_{10'}$ proche de la "cage", et deux autres ions Mg^{2+} se fixant l'un à $O_5^{(-)}$ et $C = O_{10}$, et l'autre à $O_{5'}^{(-)}$ et $C = O_{10'}$, les autres ligands étant des molécules de solvants (eau, acétone).

Parmi les différents complexes obtenus en milieu acétonique, seul le complexe P_1 (Mg/Pigment = 1) présente une similitude spectrale évidente avec les complexes ternaires : Ls (ou Rg) - ion divalent - acide nucléique (voir 3ème partie). Nous allons donc étudier plus en détail ce complexe.

2ème PARTIE - CHAPITRE III

ETUDE DU POLYCHELATE (Ls - ion divalent) (1 : 1)

-:-:-:-:-

Le polychélate sera d'abord mis en évidence par une étude cinétique en absorption en DC et en DOR , et par des études en viscosimétrie, osmométrie thermique différentielle et ultracentrifugation.

Une étude en R P E fournira ensuite la distance minimum entre les ions métalliques du complexe $(Ls - Mn)_n$.

Enfin un modèle du complexe P sera envisagé.

1) Mise en évidence du polychélate $(Ls - Mg)_n$

a - Etude cinétique de la formation du complexe P_1 (Ls:Mg) (1:1)

Le but de cette étude est de montrer que la formation du complexe P suit un processus de "polymérisation" La vitesse de "polymérisation" a été suivie en spectroscopie d'absorption visible et en dichroisme circulaire. Cette vitesse varie différemment selon que les solutions sont agitées en continu ou non. Elle varie également avec le pourcentage d'eau du milieu.

a.1-Etude cinétique avec agitation continue

Une agitation magnétique continue est assurée directement dans la cuve de mesure qui est en outre thermostatée à 20°C. Les ions magnésium ($MgCl_2$) tel que (Mg : Ls) = (1:1) sont ajoutés à la solution de lutéoskyrine à l'aide d'une micro-seringue Hamilton . On enregistre l'absorption à une longueur d'onde fixe caractéristique du complexe P_1 (λ = 490 nm). Dès l'addition de

$MgCl_2$ (temps t_o), on observe une variation brutale d'absorption, correspondant à la formation des complexes monomériques (complexes M). L'intensité d'absorption varie ensuite en fonction du temps, plus ou moins rapidement selon la concentration du pigment. Les courbes de la figure 39 représentent la différence d'intensité d'absorption entre l'instant de mesure (t) et l'instant (t_o) du mélange. Les valeurs des vitesses initiales de formation du complexe, données par les pentes des tangentes à l'origine des courbes Δ (DO) en fonction du temps, varient exponentiellement en fonction de la concentration en pigment (figure 40a). Ces résultats montrent que la réaction étudiée ne suit aucune loi simple de cinétique (PANNETIER et SOUCHAY, 1964). La complexité du mécanisme réactionnel peut encore être mise en évidence par la détermination de l'ordre de la réaction .
L'ordre $\underline{n}$ de la réaction de vitesse $V = \frac{dx}{dt} = kc^n$ est donné (PANNETIER et SOUCHAY 1964, TONNELAT 1968) par la pente de la droite $\log V = f(\log c)$. D'après la figure 40b , $\underline{n}$ croit exponentiellement en fonction de la concentration, suggérant l'existence d'une polymérisation.

a.2-Etude cinétique en l'absence d'agitation continue

Le mélange des réactifs (Mg^{2+} et Ls) est obtenu par agitation de la solution, juste après addition du $MgCl_2$. La solution n'est plus agitée ensuite et subit l'agitation brownienne au cours des mesures. Nous avons suivi en fonction du temps les variations spectrales de ces solutions (à différentes concentrations) en absorption, en dispersion optique rotatoire (DOR) et en dichroisme circulaire (DC).

Les variations de DC en fonction du temps ont été observées à une longueur d'onde fixe caractéristique (495 nm). Comme en absorption, une variation brutale de l'intensité de DC se produit dès l'addition de $MgCl_2$. Contrairement au cas d'une agitation continue, la transformation (complexe M $\rightleftharpoons$ complexe P1) reste peu importante au début. Les intensités spectrales ne varient que très lentement en fonction du temps pour les faibles

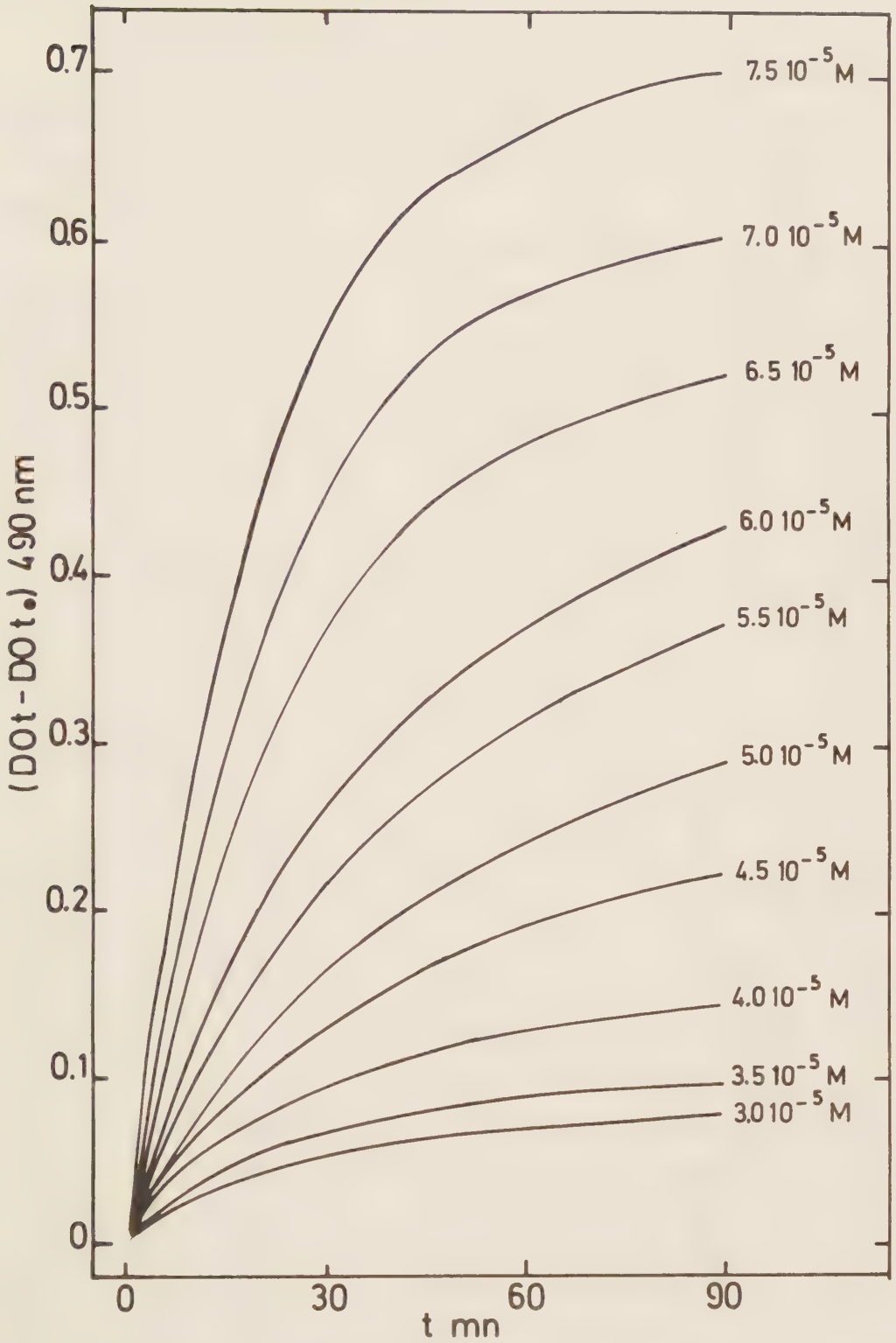
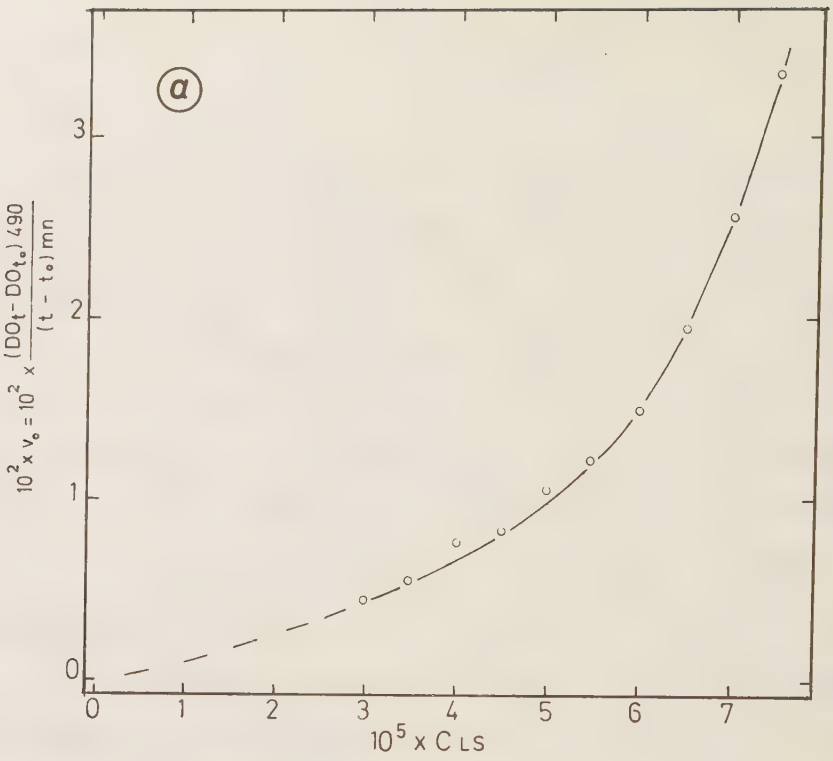


FIGURE 39 - CINETIQUE DE FORMATION DU COMPLEXE P_1 (Ls : Mg) (1:1)

Variation en fonction du temps de la différence de DO à 490 nm entre l'instant t_{mn} de mesure et l'instant initial t_o du mélange des solutions de (Ls + $MgCl_2$) dans l'acétone aqueux basique (2% d'eau, NaOH/Ls = 4 ; $MgCl_2$/Ls = 1), thermostatées à 20°C et agitées en continue (voir texte).



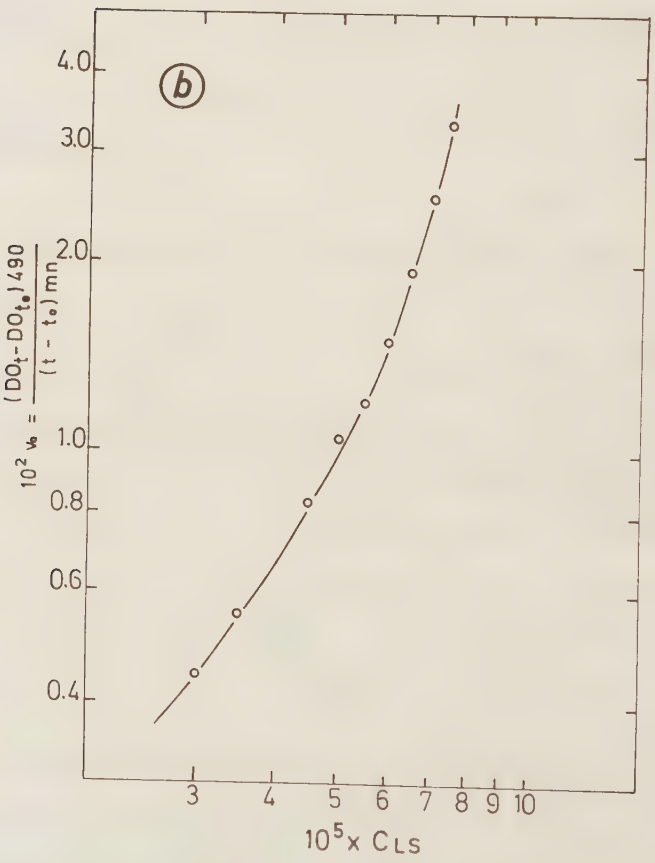


FIGURE 40 - VITESSE DE FORMATION (a) DU COMPLEXE P_1 ET ORDRE DE LA REACTION (b) : COMPLEXE M $\rightleftharpoons$ COMPLEXE P_1 (Conditions expérimentales de la figure 39).

concentrations ($C_{Ls} < 4{,}5.10^{-5}M$). Cependant l'intensité DC croit très rapidement pour les concentrations plus élevées comme le montre la figure 41 .

La cinétique étant suffisamment lente, nous avons pu suivre les changements des spectres en fonction du temps. Cette étude a été réalisée en absorption et en dispersion optique rotatoire (D O R) à l'aide d'appareils (Varian-Cary 14 et Cary 60) équipés d'un dispositif d'enregistrement répétitif. Nous avons ainsi obtenu les spectres d'absorption et de D O R à différentes concentrations de Ls en solution, comme précédemment, dans l'acétone aqueux à 2 % en eau, pour des rapports OH/Ls = 4 et $Mg/Cl_2/Ls = 1$. Pour chaque concentration les spectres sont enregistrés pendant 60 h, d'abord toutes les 7 mn au cours de la première heure, puis tous les quarts d'heure au cours des deux heures suivantes, ensuite toutes les demi-heures et enfin toutes les heures.

En absorption, les spectres évoluent en fonction du temps, de la forme "complexe M" (figure 29) à la forme "complexe P_1'' (figure 33) pour Ls/Mg = 1. La variation maximum de l'intensité d'absorption est obtenue vers 485 nm. Les variations de la densité optique à cette longueur d'onde entre l'instant t et l'instant t_o' (2 mn après addition du $MgCl_2$) sont représentées dans la figure 42 a où par souci de clarté, tous les points expérimentaux ne sont pas mentionnés. Les pentes des tangentes à l'origine donnent les valeurs des vitesses initiales de formation. Ces valeurs sont reportées en ordonnée de la courbe de cinétique (figure 43 a).La comparaison entre cette dernière courbe et celle correspondante de la figure 40 a) nous donne deux indications : 1) En l'absence d'agitation, la vitesse de réaction croît comparativement beaucoup plus rapidement pour les concentrations élevées du pigment ($C_{Ls} > 4.10^{-5}M$) que pour les faibles concentrations. 2) Pour une valeur de concentration donnée, la vitesse de réaction sans agitation est plus faible qu'en présence d'une agitation continue. Les valeurs des vitesses initiales (exprimées en $Mole.l^{-1}.cm.minute^{-1}$) sont données dans le tableau suivant :

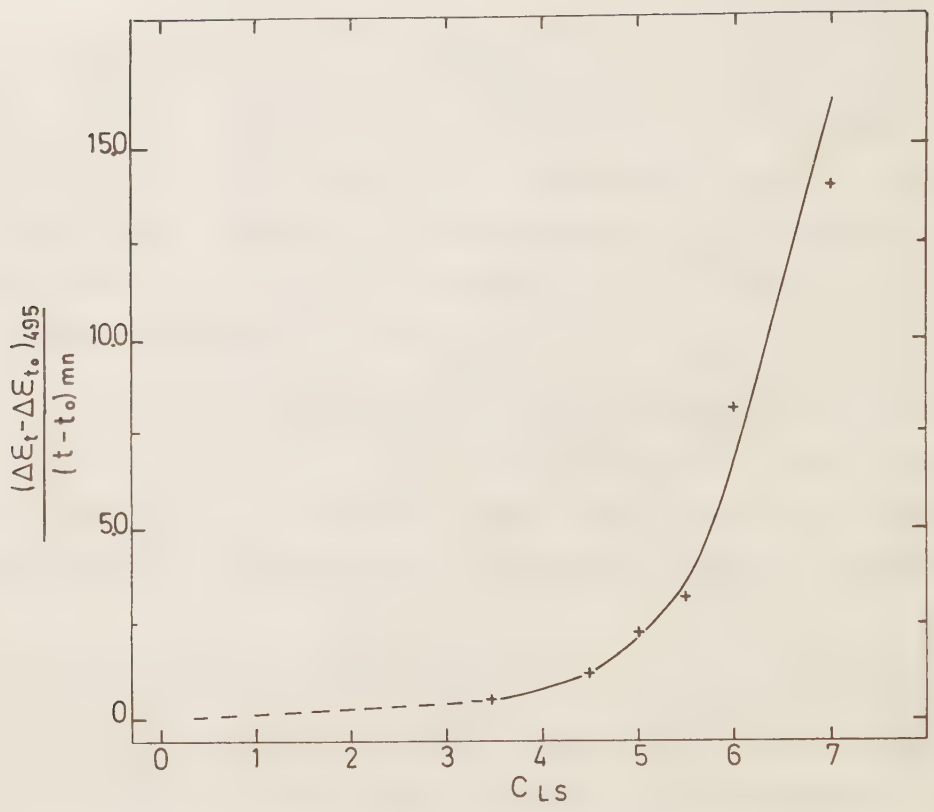


FIGURE 41 - VITESSE DE FORMATION DU COMPLEXE P_1 (Ls : Mg)(1:1) SUIVIE EN DICHROISME CIRCULAIRE A λ = 495 nm (thermostatation à 20°C, absence d'agitation continue)

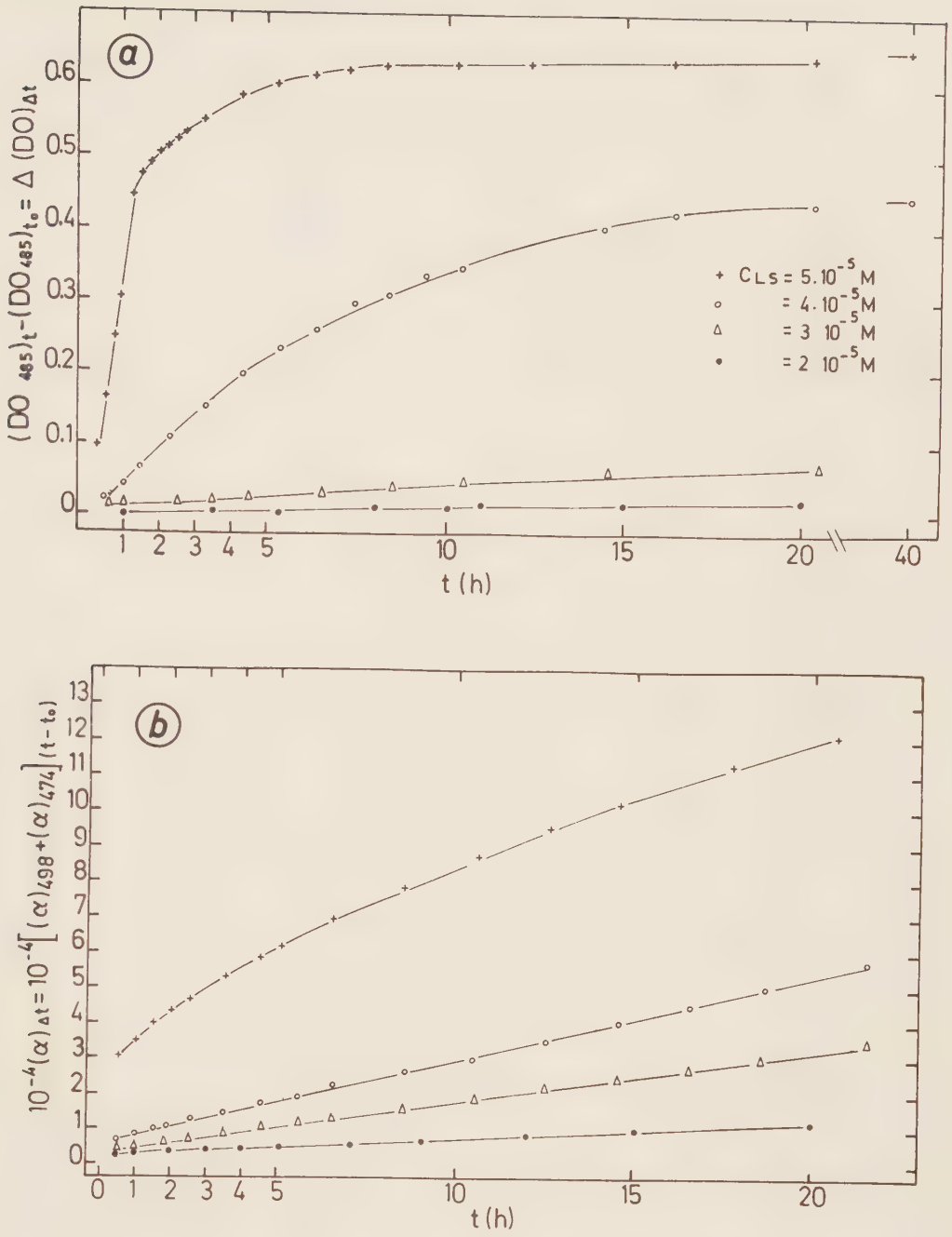


FIGURE 42 - CINETIQUE DE LA REACTION COMPLEXE M $\rightleftarrows$ COMPLEXE P_1 PAR SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION (a) ET DE DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE (b).

Les spectres sont enregistrés de 520 nm à 350 nm, à des intervalles de temps différents, à l'aide de spectrophotomètres Cary 14 et Cary 60 équipés de dispositifs d'enregistrement répétitif.

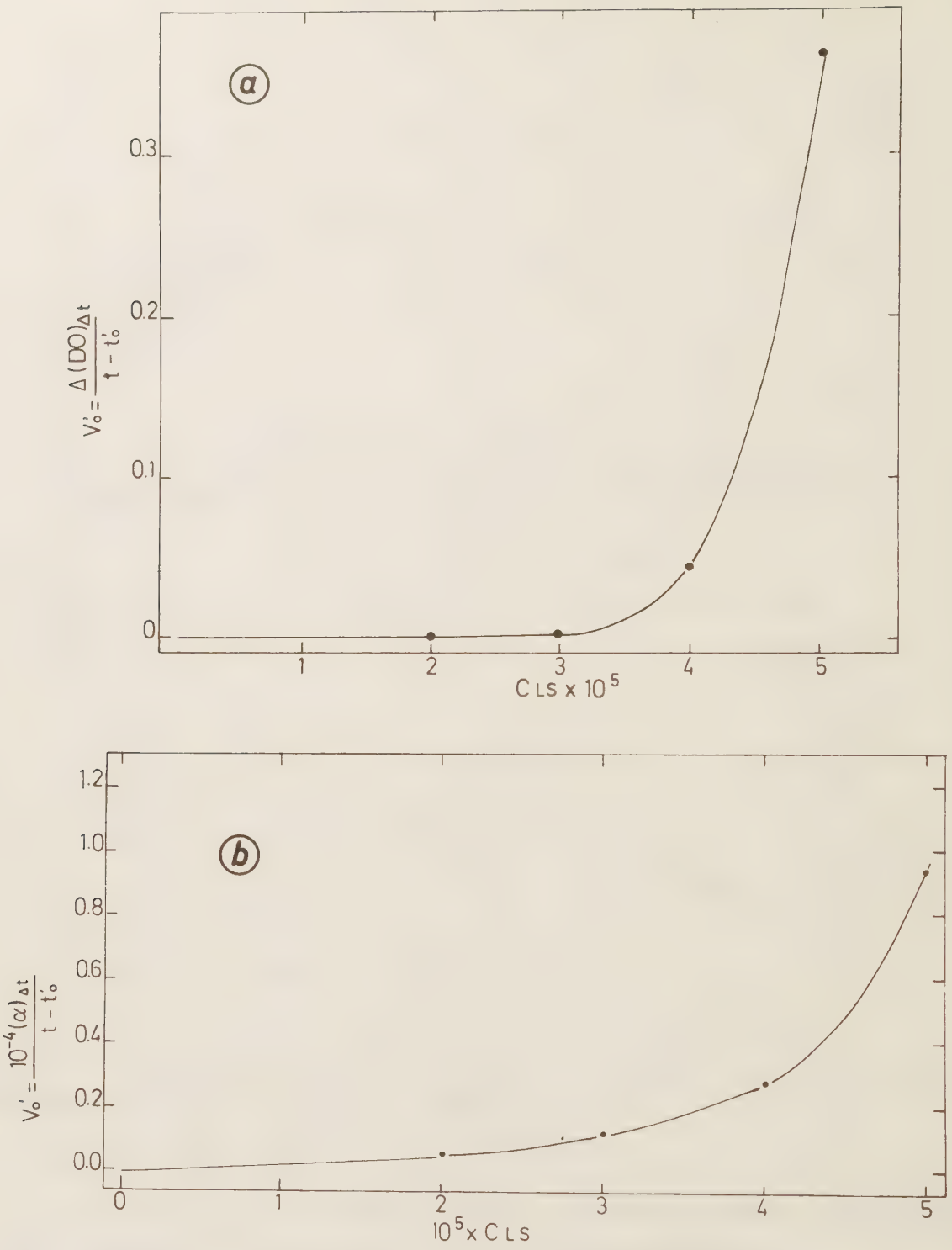


FIGURE 43 - VITESSE DE FORMATION DU COMPLEXE P_1 (Ls + Mg)(1:1) SUIVIE EN ABSORPTION (a) ET EN DOR (b).
(Conditions expérimentales de la figure 42).

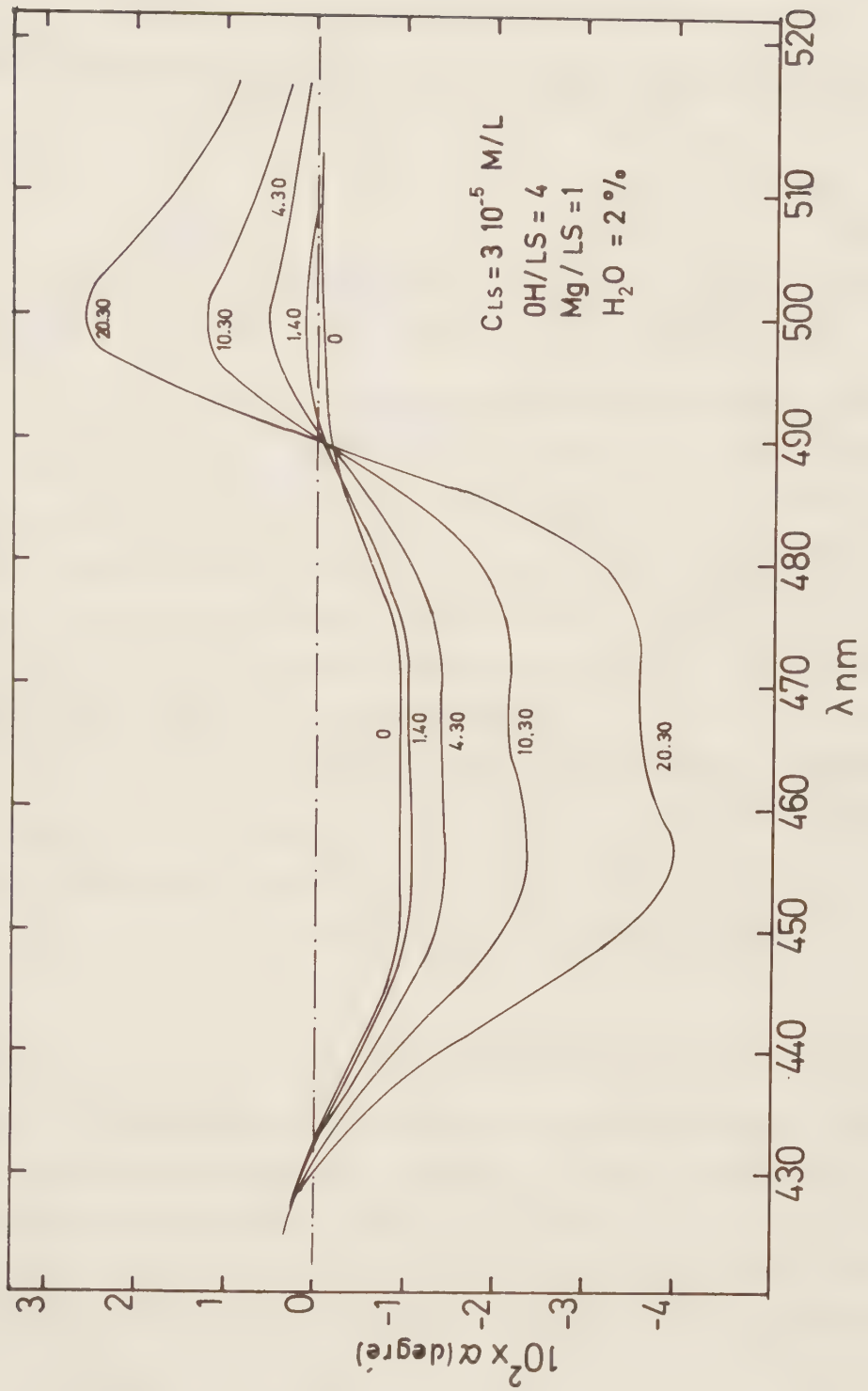


FIGURE 44 - SPECTRES DE DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE

Evolution en fonction du temps du mélange (Ls + $MgCl_2$) en milieu acétone aqueux (conditions expérimentales de la figure 42).

C_{Ls}	$10^2 x V_o$ (avec agitation)	$10^2 x V'_o$ (sans agitation)
$C = 3.10^{-5}$	0,44	0,0028
$C = 4.10^{-5}$	0,66	0,077
$C = 5.10^{-5}$	1,05	0,625

TABLEAU 4 - Comparaison des vitesses initiales V_o et V'_o (DO_{495nm}).

En dispersion optique rotatoire, l'évolution des spectres en fonction du temps est représentée dans la figure 44 à titre d'exemple. Après deux heures, on observe un point isobeste vers 489 nm. Ceci suggère que la contribution à l'activité optique des complexes M est négligeable et que la bande de dispersion vers 500 nm croit en fonction du temps proportionnellement à la concentration du "polymère" formé (Fig.42 b). La courbe inférieure de la figure 43 représente la variation des vitesses de réaction en fonction de la concentration en Ls. Le temps t'_o dans ce cas (λ=500 nm) est environ 10 mn. La lenteur de l'enregistrement (30 mn) des spectres peut fausser plus ou moins les mesures des vitesses. Néanmoins le phénomène observé est comparable à celui obtenu en DC et en absorption.

a.3-Influence du pourcentage d'eau

Nous avons étudié la cinétique de formation du complexe P dans le mélange acétone - eau pour trois concentrations en lutéoskyrine (2, 3 et 4.10^{-5}M) et pour différents pourcentages d'eau. Cette étude a été réalisée en absorption, par enregistrement répétitif de spectres, en l'absence d'agitation continue, à 20°C, avec OH/Ls = 4, Mg/Ls = 1. Les résultats sont résumés dans la figure 45 . D'après ces résultats la vitesse de réaction croit, d'une part avec la concentration du pigment pour un pourcentage d'eau fixé et d'autre part avec le pourcentage d'eau, pour une concentration de Ls choisie. Le rôle de l'eau est plus difficile à comprendre. Une augmentation de la constante diélectrique dûe à un pourcentage d'eau plus élevé peut changer la

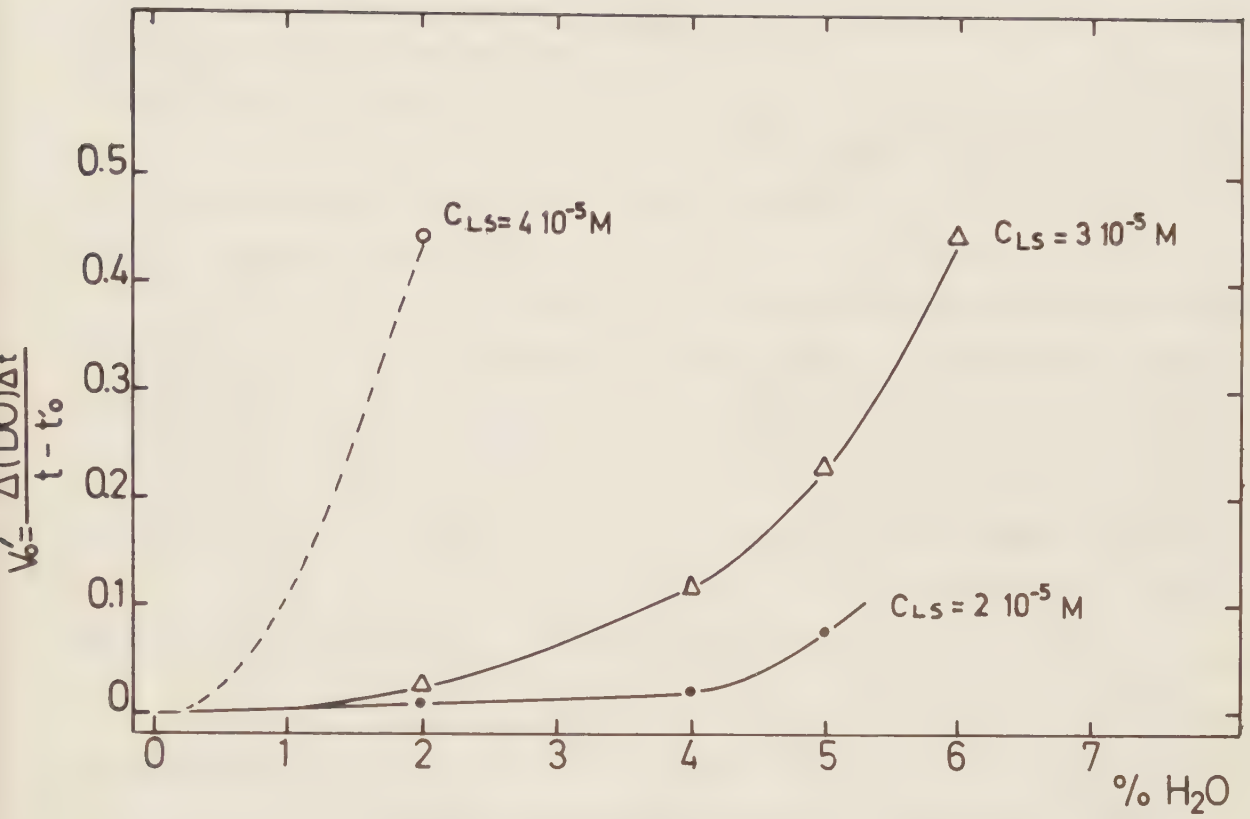


FIGURE 45 - INFLUENCE DU POURCENTAGE D'EAU SUR LA VITESSE DE LA REACTION : COMPLEXE M $\rightleftharpoons$ COMPLEXE P_1

La vitesse V'_o représente la variation, en fonction du temps, de la densité optique correspondant à la formation de P_1 (DO_{485nm}). Les spectres sont enregistrés de 550 à 350 nm, à des intervalles de temps programmés par un dispositif d'enregistrement répétitif. Les solutions de lutéoskyrine, de concentrations indiquées sur les courbes, sont thermostatées à 20°C en l'absence d'agitation continue.

stabilité du complexe (Van UITERT et al 1953, IRVING et ROSSOTTI 1956). L'eau peut encore soit catalyser la réaction (SOUCHAY et LEFEVRE, 1969) soit entrer dans la composition même du complexe sous forme de ligand (BECK, 1970).

Notons que la présence d'eau est nécessaire dans tous les cas, à la formation du complexe P_1. En effet si l'on ajoute du perchlorate de magnésium anhydre à une solution de Ls dans l'acétone basifié par l'hydroxyde de tétraméthyl ammonium (TMAH), le complexe P_1 ne se forme pas. Un certain nombre de molécules d'eau entre donc dans la composition du complexe P_1. Dans cette hypothèse, l'addition de $MgCl_2$, 6 H_2O à une solution de Ls basifiée par NaOH entrainerait la formation immédiate des complexes électrostatiques ML_2 sous la forme $(Ls)^{4-}$ $(Mg, 6H_2O)^{2+}$ $(Ls)^{4-}$ et M_3L_2 sous la forme $(Mg, 6H_2O)^{2+}$ $(Ls)^{4-}$ $(Mg, 6H_2O)^{2+}$ $(Ls)^{4-}$ $(Mg, 6H_2O)^{2+}$. En fonction du temps, les ions hydratés perdraient ensuite 2 molécules d'eau par ion pour donner des complexes mixtes, de nature semi-polaire, plus stables et susceptibles d'être prolongés pour former un polychélate.

b - Etude en viscosimétrie, osmométrie, thermique différentielle et ultracentrifugation.

L'existence d'un polychélate a été mise en évidence par d'autres techniques que la spectrophotométrie d'absorption et de DC .

b.1-Mesures de viscosité

Les mesures de viscosité nécessitent l'emploi de concentrations élevées en pigment ($c \geq 0{,}01$ M). En milieu acétonique ou éthanolique aqueux (10 % d'eau), à ces concentrations il y a formation de gel de complexe P_1. Afin d'éviter la précipitation, les gels sont obtenus à partir de solutions diluées de complexes P_1 ($C_{pigment} \simeq 1$ mM, NaOH/Pigment = 4 , $MgCl_2$/Pigment = 1) par évaporation du solvant.

La viscosité des gels a été mesurée à l'aide d'un viscosimètre de Couette (Rhéostest 2). La viscosité, très importante au début ($\eta \simeq$ 150 000 centipoises, tension de cisaillement =

9 200 dyne/cm^2, dans le cas du gel de polychélate de Ls) chute rapidement en fonction du temps et de la vitesse de déformation.

Le spectre d'absorption du gel ne présente pas d'hypochromicité par rapport à celui de la solution, contrairement par exemple au cas d'un empilement de molécules planes (gel de guanosine - CHANTOT, 1973).

Ces résultats confirment la nature"polymérique" du complexe P_1 et indiquent son aptitude à établir des associations interchaînes par des liaisons faibles (TONNELAT, 1973). La présence d'au moins dix pour cent d'eau dans le solvant est nécessaire à la formation du gel ; ce qui suggère l'existence de couches d'hydratation entre les chaînes de polychélates (HERMANS , 1949).

b.2-Etude en osmométrie thermique différentielle

Cette technique, basée sur les propriétés colligatives des solutions (EDSALL et WYMAN, 1958), est utilisée pour la détermination de masse molaire moyenne en nombre ($50 < \overline{Mn} < 25\ 000$) (LEWIS et RANDALL 1961, ARMSTRONG 1969). Elle permet d'estimer le degré de polymérisation dans les cas relativement simples (seulement deux constituants en mélange), comme celui de l'autoassociation du 9 éthyladénine (NAGEL et HANLON, 1972). Lorsque le système contient plus de deux espèces de molécules, il est difficile voire impossible de déterminer tous les paramètres nécessaires au calcul de la masse moléculaire. Nous avons utilisé cette technique pour 1) calculer la masse molaire moyenne des pigments Ls et Rg en solution concentrée, valeur qui nous informe sur le degré d'autoassociation des pigments , 2) obtenir une preuve supplémentaire de polymérisation en suivant la formation du complexe P_1 .

Matériel et Méthode : L'appareil utilisé (Hewlett Packard - V.P.O. 302 B) mesure la différence de potentiel ΔV , liée à la différence de tension de vapeur, entre la solution étudiée et la solution de référence. Les masses molaires sont données par

la relation $\Delta V = K \frac{C}{M}$ (cas des solutions idéales)

ou à partir de la relation $\frac{\Delta V}{C} = \left(\frac{\Delta V}{C}\right)_{C \to 0} (1 + \Gamma_2 C + \Gamma_3 C^2 + \ldots)$

(cas des solutions non idéales)

où K = constante du solvant, C = molarité du solution (g/kg)
M = masse molaire du soluté et Γ_2 , Γ_3 ... = coefficients du viriel

La chambre de mesure (figure 46) thermostatée à 30°C (± 0,001 °C) est saturée de vapeur de solvant. A l'aide des seringues M et R on dépose une goutte de chaque solution (mesure et référence) sur les thermistors correspondants. L'écart de température entre les deux thermistors (Δ T limite = 0,0001 °C) se traduit par une différence de potentiel sortie sur enregistreur.

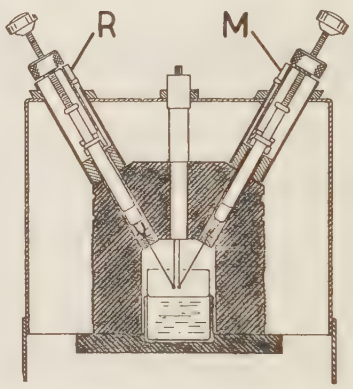


Fig. 46 : Chambre de mesure Hewlett-Packard Model 302

Résultats et discussion :

1 - Détermination de la masse molaire des pigments :

Ces mesures sont faites dans l'acétone (Uvasol - Merck). La constante K = 14 200 est obtenue par étalonnage à l'aide de solutions de biphényle (VOISIN et al, 1968). Les masses molaires obtenues $(\overline{Mn})_{Ls} = 590$ et $(\overline{Mn})_{Rg} = 550$ étant voisines des valeurs connues ($M_{Ls} = 574$, $M_{Rg} = 542$), l'autoassociation des pigments seuls, en solution, aux concentrations utilisées (5-20 mM/l), est donc exclue.

2 - Etude de la "polymérisation" :

Pour mesurer la valeur de la masse molaire du polymère formé il faudrait connaître au moment de la mesure l'état d'ionisation du pigment , la concentration des ions libres et celle des

molécules solvatées. La complexité du système étudié n'a pas permis de déterminer ces différents paramètres. Cependant, il a été possible de suivre, en fonction du temps, la diminution de ΔV traduisant un phénomène de "polymérisation". Utilisant d'une part l'ammoniaque au lieu de la soude en partie insoluble en milieu acétonique dans les conditions utilisées (10^{-2}M), ne pouvant d'autre part prendre comme référence l'échantillon $MgCl_2$/Acétone basique (précipité de $Mg(OH)_2$ à $pH_{app} > 10$) nous avons mesuré ΔV de deux manières différentes :

1) - soit en remplaçant $MgCl_2$ par $Ca(NO_3)_2$ dans les solutions de mesure et de référence. On suit dans ce cas la diminution du nombre de molécules de pigment libre au cours du temps.

2) - soit en prenant comme référence une solution de Ls/Acétone basique sans Mg^{++}. On mesure alors la disparition progressive des ions $[Mg^{++}]$ de la solution à mesure que ceux-ci s'associent au pigment pour former le polychélate.

Les résultats montrent dans les deux cas que ΔV décroît exponentiellement en fonction du temps, ce qui est compatible avec la formation d'un polychélate.

b.3 - Ultracentrifugation

La sédimentation par ultracentrifugation analytique d'une solution acétonique (2 % d'eau) de complexe P_1 ($C_{Ls} = 7{,}5.10^{-5}$M, Mg/Ls = 1, NaOH/Ls = 4) donne une valeur de S_{20} voisine de 50. Le S_{20_W}, ramené au milieu aqueux, voisin de 15, correspond à un poids moléculaire proche de 10^6. Dans ces conditions, le degré de polymérisation n serait égal à $10^6/600 \simeq 1{,}6.10^4$. On soulignera la faible polydispersité du système, montrant que les molécules de polychélate ont des longueurs très voisines. Le nombre de chaînes, dans les conditions utilisées, serait de l'ordre de : $\dfrac{7{,}5.10^{-5} \times 6.10^{23}}{1{,}6.10^4} \simeq 2{,}8.10^{15}$ par litre de solution.

En conclusion, les mesures de viscosité et d'osmométrie thermique différentielle montrent que le complexe P_1 est un polychélate . L'ultracentrifugation révèle que ce polymère est assez long, homogène et stable.

c - Etude de la stabilité du polychélate en présence de solvants dénaturants ou complexants.

c.1-Solvants dénaturants

L'addition d'urée 6 M ou de lauryl sulfate (concentration finale 3 %), avant ou après formation en milieux aqueux du complexe P_1, abaisse légèrement (10 %) l'intensité des spectres d'absorption et de DC du complexe, mais ne modifie pas l'allure de ces spectres. En fonction du temps, on observe toujours une précipitation du "polymère", quoique plus lente en présence de détergent. La structure du "polymère" n'est donc pratiquement pas affectée par la dissociation ou de liaisons hydrogène ou d'interactions de caractère hydrophobe.

c.2-Solvants complexants

Nous avons vu que les solvants comme la pyridine ou le DMSO qui complexent les ions divalents (TCHOUBAR 1964, SCHLÄFER et SCHAFFERNICHT 1960) empêchent la formation du complexe P_1. Par contre, l'addition de ces solvants à une solution acétonique de polychélate ne modifie ni l'allure ni l'intensité des spectres optiques du complexe. En outre, le polychélate peut être isolé, desséché et remis en solution dans la pyridine ou le DMSO aqueux (2 %). Les spectres (absorption et DC) obtenus sont toujours caractéristiques du polychélate. D'autres agents chélatants plus puissants, comme l'EDTA, ne peuvent pas non plus dissocier le précipité de polychélate obtenu en solution aqueuse. Ces résultats indiquent que les ions Mg^{2+} engagés dans le polychélate sont bien stables vis à vis des agents complexants utilisés.

En conséquence il apparait que la constante de dissociation du métal associé aux complexes de type M est supérieure à celle du magnésium engagé dans le polychélate.

2) Etude du polychélate $(Ls - Mn)_n$ en RPE.

L'ion Mn^{2+} permet d'obtenir un polychélate $(Ls\ Mn)_n$ ayant les mêmes caractéristiques spectrales (absorption et DC) que celles de $(Ls\ Mg)_n$. Une étude en résonance paramagnétique électronique de l'ion Mn^{2+} $(3d^5)$ permettrait dans ce cas de déterminer la distance entre les ions Mn (II) engagés dans le polychélate.

L'étude de RPE a été réalisée à l'aide de l'appareil Varian V 4502 fonctionnant dans la bande X (9120 Mc/s)et doté d'un dispositif de variation de température . Les mesures ont été effectuées à 25°C et - 150°C, les solutions (1,5 ml) de Ls (c = 5 mM/ l) étant distinctes pour les différentes concentrations en $MnCl_2$ utilisées.

Nous avons comparé les résultats obtenus avec les solutions de polychélates à ceux des solutions de $MnCl_2$ de référence.

a - Etude des solutions de $MnCl_2$

Les spectres de RPE des solutions de $MnCl_2$ dans l'eau distillée, l'acétone, le méthanol ou l'éthanol, présentent, à 25°C, 6 raies hyperfines équidistantes dont la largeur totale est de 500 G (Figure 47a). A basse température (-150 °C), les six raies hyperfines ne sont plus équidistantes et présentent chacune un multiplet (structure fine) (Figure 47 b). Les valeurs calculées, à partir des spectres,dans le méthanol, des paramètres g (facteur de décomposition spectroscopique), A (paramètre de couplage hyperfin) et D (paramètre de la structure fine) caractéristiques de l'ion Mn (II) de symétrie octaédrique (WALSH et al 1963, LOW 1960, TSAY et al 1972) sont les suivantes :
$g = 2{,}002 \pm 0{,}001$; $A/g\beta = (95 \pm 2)$ G et $D/g\beta = (88 \pm 2)$ G.

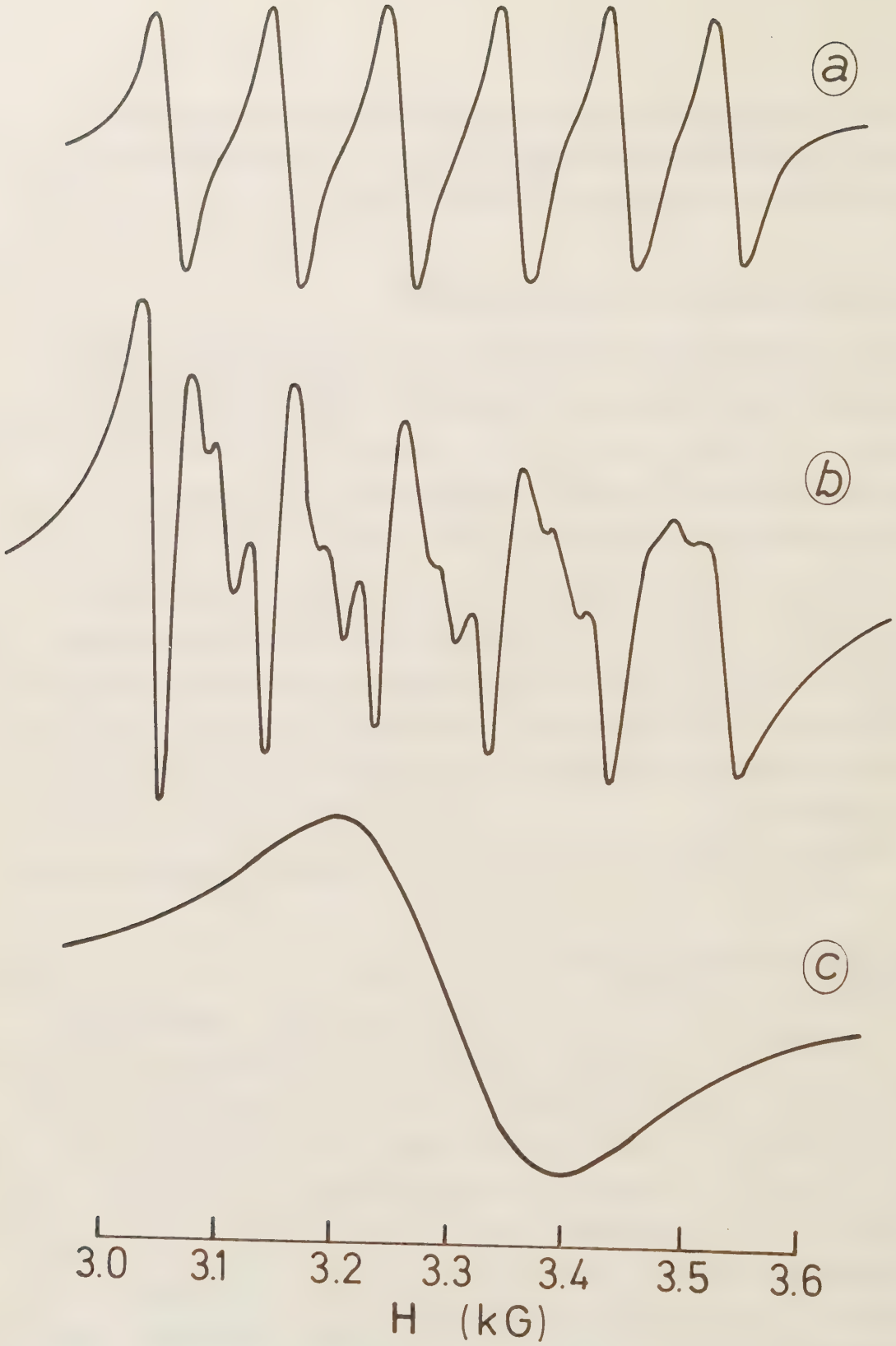


FIGURE 47 - SPECTRES DE RPE DE $MnCl_2$ en solution :

a) dans le méthanol (t = 25°C)
b) dans le méthanol (t = -150°C)
c) dans l'acétone basique aqueux (15% d'eau $pH_{app.}$ 10,5 t = 25°C ou -150°C)

L'addition de lutéoskyrine à ces solutions de $MnCl_2$ ne modifie pas les spectres RPE, indiquant l'absence de formation de complexe P_1.

Dans les solvants basiques [acétone-eau (85-15) pH app. 10,5 ou tampon aqueux NH_4OH/NH_4Cl 0,1 M , pH 8,5] favorables à la formation de polychélate, les spectres RPE de référence de $MnCl_2$ sont différents, dans la plupart des cas, de ceux obtenus dans l'eau. En milieu acétonique basique, le $MnCl_2$ précipite ; le spectre RPE de la suspension présente, à + 20 °C ou - 150 °C, une seule raie large d'environ 300 G . Dans le tampon aqueux pH 8,5 , on observe aussi une seule raie RPE (240 G de large) à basse température ; à la température ambiante, le spectre du $MnCl_2$ soluble présente, comme dans l'eau distillée, six raies hyperfines de largeur totale $\simeq$ 500 G.

b- Etude du polychélate

L'addition de $MnCl_2$ à des solutions basiques (solvants étudiés précédemment) de lutéoskyrine conduit à la formation de polychélate, contrôlée par spectroscopie d'absorption et DC. Le spectre de RPE présente une seule raie de largeur 780 G (acétone basique) ou 720 G (tampon aqueux). La différence de largeur de raie par rapport à la référence ($MnCl_2$) permet de titrer le Mn (II) engagé dans le polychélate.

La courbe (- Δ -) de la figure 48 représente la variation (à -150 °C) en fonction du rapport r = Mn/Ls de la largeur de raie spectrale des solutions dans l'acétone basique. La largeur de raie reste constante (780 G) pour $r \leq 1$, et décroît pour $r > 1$ tendant vers la valeur limite de la référence $MnCl_2$ seul (300 G).

En milieu tamponné on retrouve la stoéchiométrie de 1 à 20 °C et à - 150 °C. Pour $r > 1$, on observe à 20 °C l'apparition des 6 raies de $MnCl_2$ libre , et à - 150 °C, une diminution de la largeur de raie de 720 G à 240 G correspondant probablement à une agrégation de $MnCl_2$ (rétrécissement par échange, FREYMANN et SOUTIF 1960).

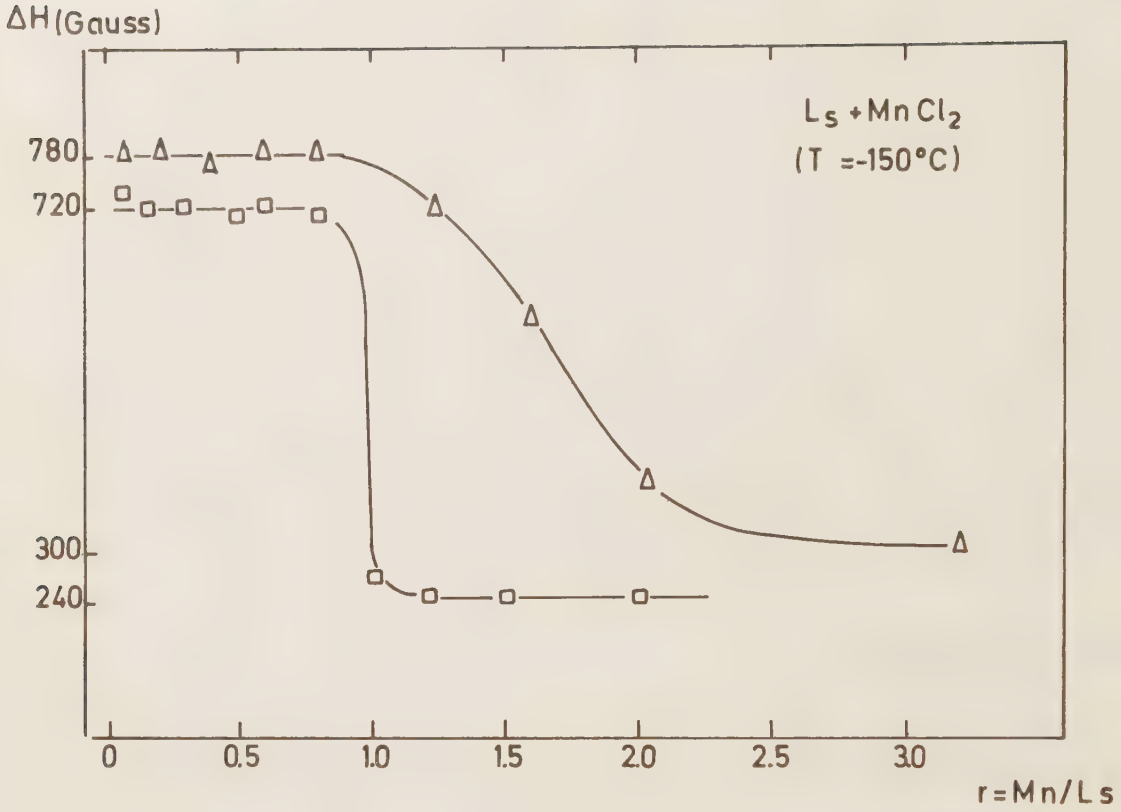


FIGURE 48 - TITRAGE DE $MnCl_2$

Variation de la largeur (Δ H) de la raie de RPE en fonction du rapport molaire Mn/Ls.

Le $MnCl_2$ est ajouté en quantité croissante à des solutions distinctes, de concentration donnée en lutéoskyrine : 5 mM.

- Δ - en milieu acétonique aqueux basique (15% d'eau basifiée par NH_4OH 0,5 M ; $pH_{app.}$ = 10,5)-le complexe Ls-Mn est soluble.

- □ - en milieu aqueux tamponné (NH_4OH/NH_4Cl 0,1 M ; pH 8,5) - le complexe formé précipite.

c - Calcul de la distance entre les ions Mn^{2+}

Le spectre RPE de Mn (II) présente six raies hyperfines lorsque la distance entre deux ions Mn^{2+} voisins est suffisamment grande (> 10 Å) pour que les interactions mutuelles soient négligeables.

Par contre, le spectre de RPE présente une raie unique, et c'est le cas du polychélate étudié, lorsque les ions Mn^{2+} sont suffisamment proches pour qu'apparaissent des interactions réciproques :

- l'une consiste en un effet d'échange par contact. Dans ce cas, la distance entre les ions Mn^{2+} est inférieure à la somme des rayons de Van der Waals, et la largeur de la raie de RPE (cas des précipités de $MnCl_2$ en milieu basique) est inférieure à celle de la somme des 6 raies hyperfines.

- l'autre est une interaction dipolaire. La largeur de la raie RPE (cas du polychélate) est supérieure à celle des six raies hyperfines. Si l'effet d'échange est négligeable devant l'interaction dipolaire, on peut alors (PAKE , 1962) calculer la distance moyenne $\underline{r}$ entre les ions, par la relation (Van VLECK, 1948) :

$$\bar{\mu}^2_{(\Delta H)} = \frac{3}{5} S(S+1) g^2 \beta^2 . \sum_{jk} (r_{jk})^{-6}$$

où $\bar{\mu}_{(H)}$ est le second moment, de valeur égale à la demi-largeur de la raie (gaussienne)

S = moment total de spin électronique (= 5/2)

g = 2.002

β = magnéton de Bohr ($0{,}927310^{-2}$ erg.G^{-1})

$\sum_{jk}(r_{jk})$ = somme des distances entre l'ion considéré et les ions voisins.

Pour un polychélate linéaire dont les chaînes sont isolées les unes des autres :

$$\sum_{jk}(r_{jk}) = 2\, r_{jk}$$

La demi-largeur de 390 G (polychélate en solution acétonique basique) donne une valeur de $r = 5,4$ Å.

Pour un nombre de voisins supérieur à deux, la distance r est supérieure à 5,4 Å.

3) Structure du polychélate

a - Mode de liaison des unités (pigment - ion divalent)

L'existence d'un polymère a été mise en évidence par spectroscopie optique (absorption, DC) et par diverses techniques (viscosité, osmométrie thermique différentielle et ultracentrifugation).

La formation du polychélate, de stoéchiométrie ion divalent/pigment = 1, pourrait être envisagée de deux façons :

1 - soit que l'ion divalent, fixé à une molécule de pigment , induise une conformation favorable à une autoassociation par empilement hydrophobe d'unités (ligand-métal). Désignons ce polymère par $(L - M)_n$.

2 - soit que l'ion divalent relie deux molécules successives de pigment par liaison semi-polaire. Le polychélate formé $(L)\succ M \prec (L)\succ M \prec (L)\succ M \prec \ldots$ sera désigné par $L-(M-L)_n-M$.

L'hypothèse d'un empilement purement hydrophobe semble exclue au moins pour deux raisons : 1°) le polychélate se forme, même à des concentrations très faibles (2.10^{-5}M), dans les solvants où ces liaisons sont défavorisées (acétone, méthanol, éthanol). 2°) Les pigments étudiés ne sont pas parfaitement plans et ont une "cage" centrale encombrante, excluant un recouvrement important de deux molécules voisines. On pourrait alors envisager un empilement par recouvrement partiel des moitiés planes de la molécule. Dans ce cas, les molécules neutres de pigment dont la conformation est aussi plane que possible (voir 1ère partie, Chapitre II),devraient s'autoassocier par empilement. Les résultats d'osmométrie thermique différentielle ont montré qu'il n'en est rien, même aux fortes concentrations utilisées.

L'ensemble des résultats expérimentaux déjà exposés confirme d'autre part la deuxième hypothèse. Les principaux arguments sont :

- l'évolution en fonction du temps de la stoéchiométrie des complexes vers une stoéchiométrie finale de 1

- l'importance de la valeur du coefficient de sédimentation (S_{20}) d'une solution diluée de complexe P_1

- la stabilité du polychélate vis à vis des agents dénaturants ou complexants.

Notons que des polychélates similaires, formés à partir d'autres composés ont été mis en évidence (BECK 1970, CHAMPETIER et MONNERIE 1969) : polychélates de tétraaminométhylméthane-Cu (II) (ZOMPA et BOGUCKI 1966) ; de bis(cétophosphonyl)-Co(II) (COTTON et al, 1967) ; de tétracétone - ion divalent (CHAMPETIER et MONNERIE, 1969) par exemple.

b - Sites de fixation des ions divalents

Les conditions de basicité nécessaires à la formation de polychélate ($7 < pH < 10$ en milieu aqueux et $pH_{app.} > 10$ en milieux acétone aqueux) permettent de retenir comme sites possibles de fixation du Mg, les carbonyles $C = O_{(10-10')}$ d'une part et les groupements phénates $C-O^-_{(4-4' \text{ ou } 5-5')}$ d'autre part. L'examen du modèle moléculaire du pigment nous permet d'envisager deux modes de fixations :

1) L'ion se fixe au milieu de la "cage" par quatre liaisons aux $C=O_{10}$, $C=O_{10'}$, $C-O^-_4$, $C-O^-_{4'}$.

2) L'ion se fixe, dans chaque moitié de la molécule, par deux liaisons aux $C=O_{10}$ et $C-O^-_{(4 \text{ ou } 5)}$.

La première hypothèse, qui ne conduit qu'à la formation d'un dimère et non à celle d'un polymère, doit être exclue.

Le deuxième mode de fixation, compatible avec la formation d'un polychélate, peut être réalisé de trois façons différentes :

1) L'ion fixé aux $C{=}O_{10}$ et $C{-}O_4^-$ d'une molécule permet l'enchaînement par liaison aux $C{=}O_{10}$, et $C{-}O_4^-$, de la molécule voisine.

2) L'enchaînement se fait de façon analogue mais sur les (CO_{10}, CO_5^-) et (CO_{10}', CO_5^-) .

Dans ces deux cas chaque molécule de lutéoskyrine est encadrée par deux ions divalents fixés symétriquement par rapport à l'axe binaire de la molécule de pigment.

3) L'ion fixé aux $C{=}O_{10}$ et $C{-}O_4^-$ d'une molécule se lie aux $C{=}O_{10}'$ et $C{-}O_5^-$, d'une molécule voisine ou vice-versa. Dans ce dernier cas il y aurait formation simultanée d'un grand nombre de polychélates différents (il existe 2^n combinaisons possibles de n monomères associés).

Pour des raisons de symétrie, ce type de fixation est, a priori peu probable. Les résultats expérimentaux rendent cette hypothèse encore plus improbable : les spectres d'absorption et de DC sont caractéristiques d'un polychélate bien défini . L'identité des spectres obtenus dans différents solvants (tampons aqueux, acétone-eau, éthanol-eau, pyridine-eau, DMSO-eau) est incompatible avec l'existence de plusieurs formes en solution. Les études cinétiques ont encore montré que les complexes (M) initiaux disparaissent du milieu réactionnel pour former un seul type de polychélate (complexe P_1). Les spectres du polychélate formés à différentes concentrations suivent la loi de Beer Lambert. Enfin l'ultracentrifugation révèle l'existence d'une distribution de longueur homogène peu probable dans le cas de n polymères en mélange.

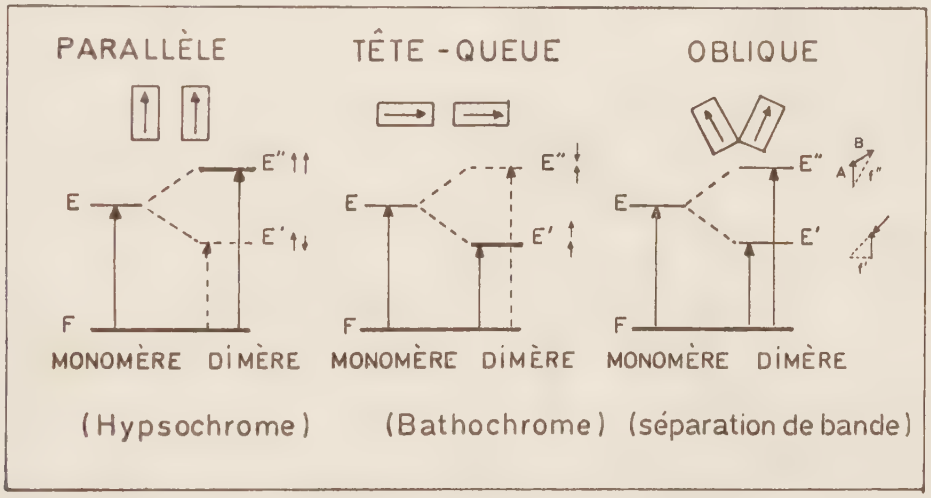
Des deux types de fixation symétrique, seul le mode de liaison $(C{=}O_{10})$ - Mg - $(C{-}O_5^-)$ semble devoir être retenu. Les résultats de RPE, l'effet d'encombrement stérique des $OH_{2\text{-}2'}$ et l'analyse des spectres d'absorption et DC, sont en faveur de cette hypothèse. Dans le cas du type de fixation $(C{=}O_{10})$-Mg-$(C{-}O_4^-)$ notamment, la distance entre les ions divalents serait au maximum égale à 4,5 Å ; or la distance minimum entre deux ions Mn(II) voisins, mesurée en RPE, est de 5,4 Å.

c - Arrangement spatial des monomères.

La théorie excitonique, basée sur le modèle quantique de FRENKEL (1931) , a été développée dans le cas des polynucléotides pour interpréter les spectres d'absorption (TINOCO 1960 et 1961 , RHODES 1961, KASHA et al 1961) et les spectres d'activité optique rotatoire (TINOCO 1963, TINOCO et al 1963).

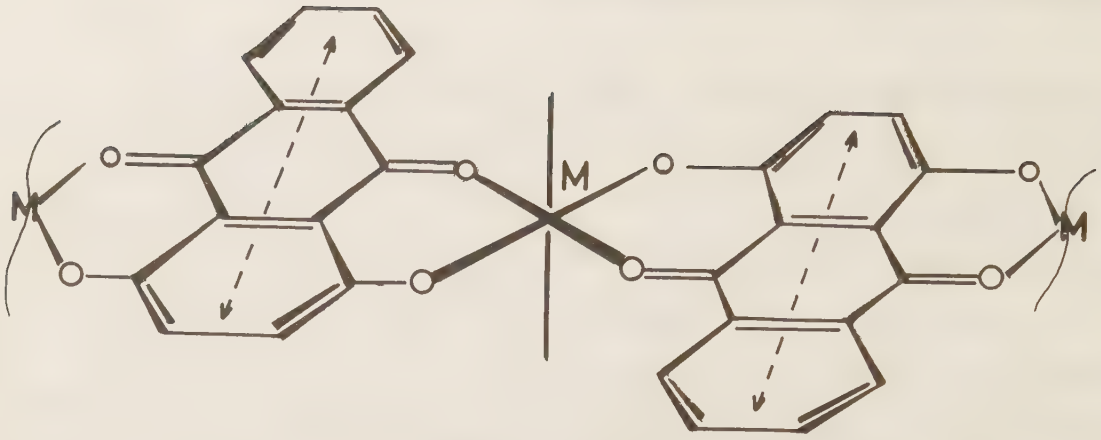
L'analyse, par cette théorie, des spectres d'absorption et de DC peut renseigner sur les orientations relatives des moments de transitions de même énergie de deux chromophores voisins.

Dans le cas des spectres d'absorption, KASHA et al (1961) ont proposé le schéma suivant :

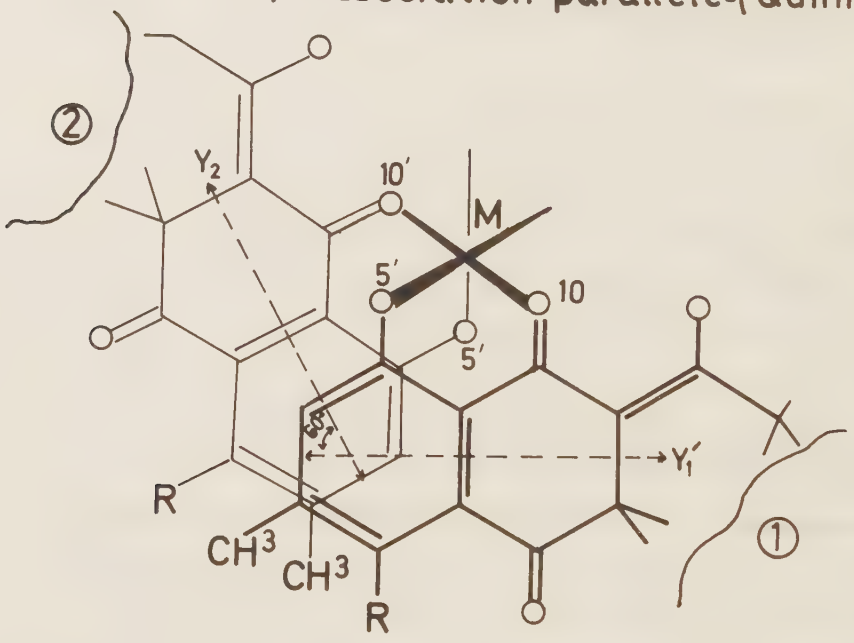


La figure 33 montre que la bande d'absorption centrée vers 461 nm de la molécule isolée est dédoublée en deux bandes situées vers 445 et 490 nm dans le cas du polychélate. Ce résultat indique que les moments de transition de deux chromophores voisins associés au même ion divalent font un certain angle entre eux, contrairement au cas de"l'association parallèle" du polychélate quinizarine - ion divalent par exemple (KORSHAK et al 1960, SUEMITSU 1963) (Figure 49).

En outre, le spectre DC du polychélate $Ls(MgLs)_n$-Mg peut être décomposé en deux courbes (Figure 50). La première courbe, constituée par une bande positive centrée vers 467 nm et de nature



a) Association parallèle-(Quinizarine)



b) Association angulaire (Ls, Rg)

FIGURE 49 - MODELES D'ASSOCIATION ENTRE LES IONS DIVALENTS ET LES DERIVES QUINONIQUES α-HYDROXYLÉS.

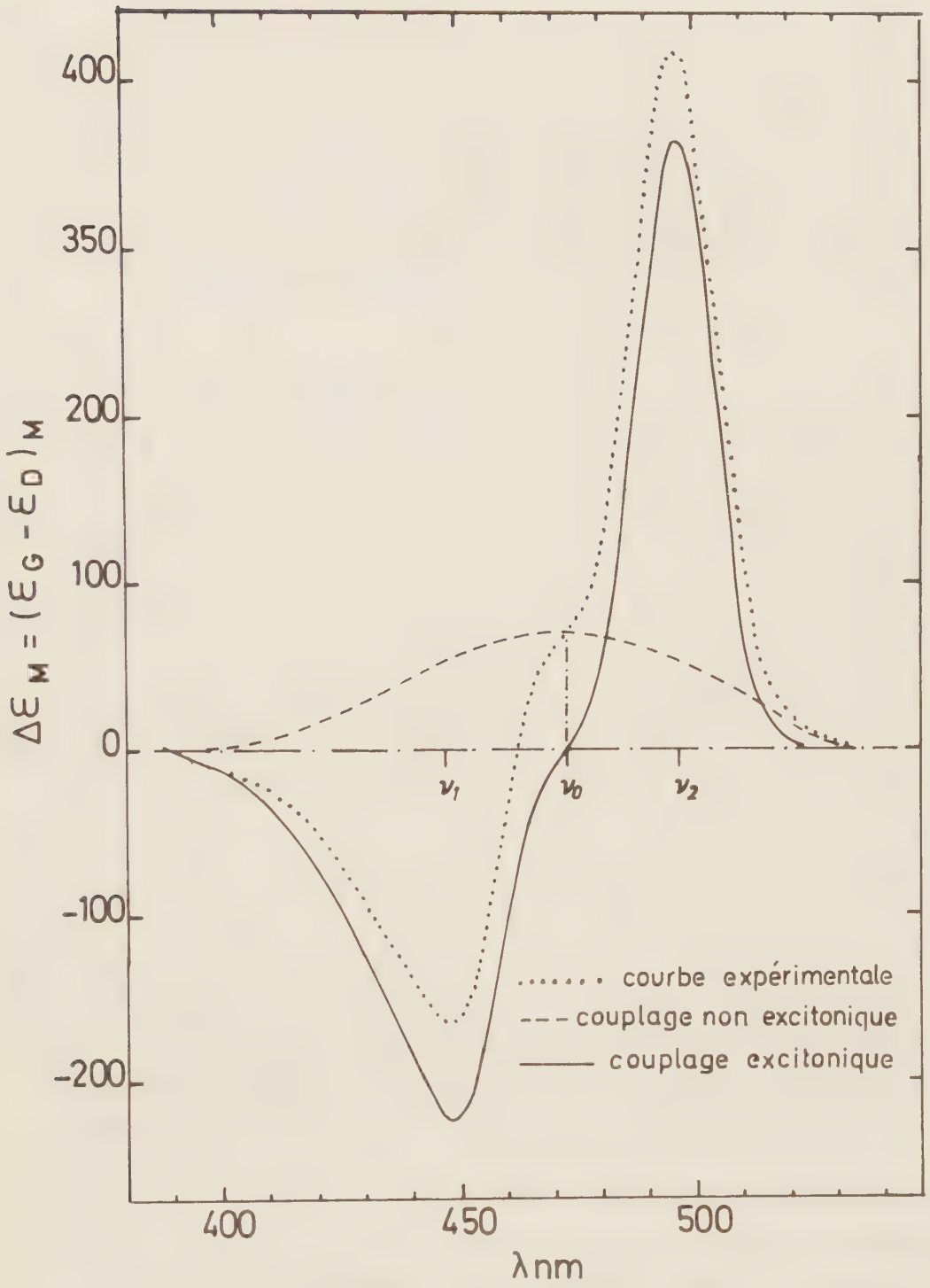


FIGURE 50 - DECOMPOSITION DU SPECTRE DE DICHROISME CIRCULAIRE DANS LA REGION 380 - 540 nm, DU POLYCHELATE Ls-(Mg-Ls)$_n$-Mg en solution dans l'acétone basique aqueux (2 % H_2O, NaOH/Ls = 4, Mg/Ls = 1)

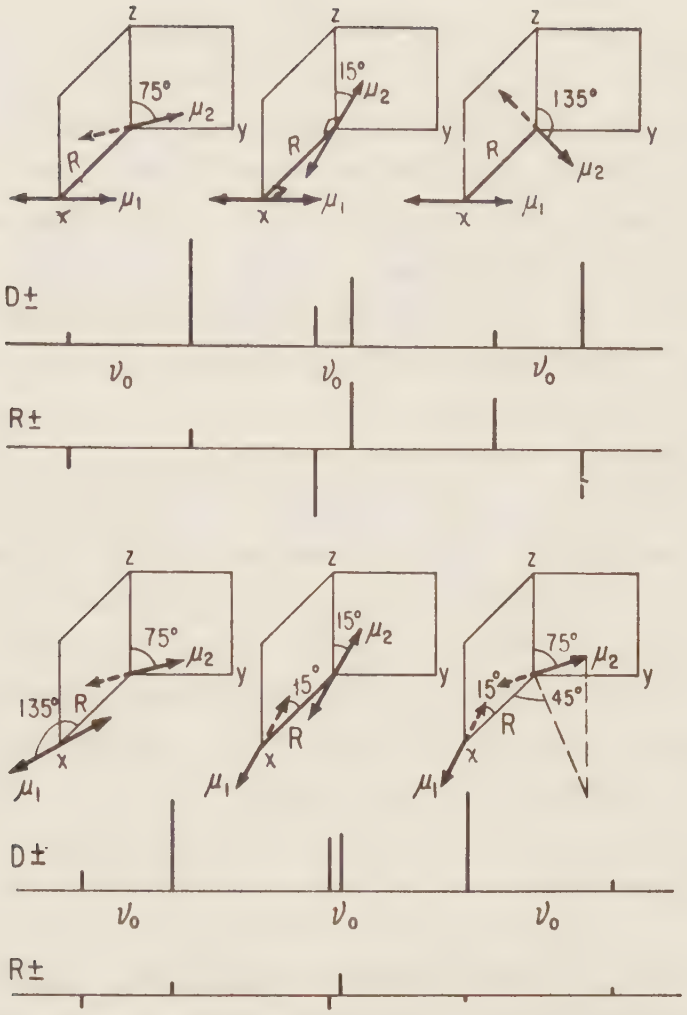
"non-excitonique", résulte probablement de l'interaction entre la transition électronique vers 467 nm d'une molécule et les transitions situées dans l'UV des molécules voisines. La deuxième courbe est représentée par deux bandes de signes opposés, centrées vers 446 et 495 nm. Le calcul de la force rotationnelle par la relation (MOFFIT et MOSCOWITZ 1959, DJERASSI 1960)

$$R = 22{,}9 \times 10^{-40} \int \Delta\varepsilon_{M(\lambda)} \frac{d\lambda}{\lambda}$$

fournit une valeur identique pour ces 2 bandes, soit $R^{+}_{-} = 350\ 10^{-40}$ u.e.s.Cette deuxième courbe, typique d'un effet excitonique (TINOCO et al 1963 , Van HOLDE et al 1965), résultant du dédoublement de la bande (467 nm) du pigment libre, implique l'existence d'un couplage important entre les moments de transition correspondants de deux chromophores voisins.

Pour évaluer l'angle de ces moments de transition on peut se référer à l'analyse de l'activité optique, selon TINOCO, 1963. L'ordre de grandeur relative des forces dipolaire ($D\pm$) d'une part et rotationnelle ($R\pm$) d'autre part, obtenues dans le cas du polychélate de Ls, permettent de ramener l'effet excitonique observé au cas b ou c de la figure (51). D'après cette figure, les moments de transitions du polychélate sont situés dans des plans parallèles et font entre eux un angle d'environ 45°-75°.

La distance entre deux chromophores voisins du polychélate liés au même ion divalent ne peut être calculée avec précision puisque l'on ne connait ni la valeur exacte de l'angle des moments de transition, ni la distance entre leurs centres de gravité. Cependant la comparaison des valeurs de la force rotationnaire des bandes excitoniques correspondant au polychélate et au poly(A) (polymère bien empilé à 0°C) (BRAHMS et al, 1966) doit permettre d'estimer la distance cherchée ainsi que le degré d'empilement du polychélate. Les forces rotationnelles de la bande positive de $Ls(MgLs)_n Mg$ et du poly(A) à 0°C sont respectivement égales à 350×10^{-40} et 35×10^{-40} environ, soit $R_{LsMg}/R_{polyA} \simeq 10$. On sait que $R\pm$ est proportionnelle au produit mixte $\vec{d}_{12} \cdot \vec{\mu}_1 \wedge \vec{\mu}_2$ où $\vec{d}_{12}$ est la distance entre les



The absorption frequencies, dipole strengths, and rotational strengths for various dimers. The bond joining the two parts of the dimer $\mathbf{R}_{12}$ is along the x-axis, and $\boldsymbol{\mu}_1$ is in the xy-plane. In the top three dimers (a–c, Table I) both $\boldsymbol{\mu}_1$ and $\boldsymbol{\mu}_2$ are perpendicular to $\mathbf{R}_{12}$; only the angle between the transition moments vary. In the next two dimers (d, e, Table I) $\boldsymbol{\mu}_2$ is left perpendicular to $\mathbf{R}_{12}$, but $\boldsymbol{\mu}_1$ is changed. In the last dimer (f, Table I) neither $\boldsymbol{\mu}_1$ nor $\boldsymbol{\mu}_2$ is perpendicular to $\mathbf{R}_{12}$.

FIGURE 51 - (d'après TINOCO, 1963)

moments de transitions $\bar{\mu}_1$ et $\bar{\mu}_2$,

$$\text{et } D \pm = \bar{\mu}_1 \cdot \bar{\mu}_2 \quad \text{(TINOCO, 1963)}$$

Le rapport R/D rend donc compte seulement de la contribution des facteurs géométriques à l'activité optique globale. La valeur du rapport des forces dipolaires correspondantes D_{Ls}/D_{AMP} étant voisine de 2 , le rapport $(R_{LsMg}/R_{polyA})/(D_{Ls}/D_{AMP}) \simeq 5$, corrigé de la force dipolaire, permet une comparaison des facteurs géométriques (angle et distance) de ces deux polymères.

En conclusion, l'effet excitonique, plus important encore pour le polychélate que pour le poly(A), implique des facteurs géométriques favorables : 1) la distance entre les chromophores de deux molécules voisines de Ls doit être minimum, c'est à dire de l'ordre de grandeur des rayons de Van der Waals des atomes ($d \simeq 3,4$ Å) ; 2) l'angle entre les moments de transition doit être supérieur à 36° (cas du Poly A), compatible avec la valeur 45° - 75° proposée précédemment.

d - Modèle du polychélate

Sur la base des résultats expérimentaux exposés ci-dessus, nous avons construit un modèle du polychélate Ls-$(MgLs)_n$-Mg, (modèle compact C.P.K., ou éclaté : modèles Beevers) - Figure 52 -

. Les critères choisis sont les suivants :

1) L'ion Mg (hexacoordiné) est fixé sur les $C{=}O_{(10)}$ et $C{-}O^-_{(5)}$.

2) La distance Mg-O est de 2,1 Å : les valeurs de la littérature étant de 2,05 - 2,13 Å pour le formiate $(HCOO)_2Mg, 2H_2O$ (OSAKI et al, 1964) et de 2,10 Å pour $(Mg, 6H_2O)^{2+}$ (DAHAN, 1974).

3) L'angle O-Mg-O est de 86°-96° (OSAKI et al, 1964).

4) Les chromophores de deux molécules voisines sont proches et presque parallèles.

Suivant ces critères, le modèle peut encore être construit de deux façons selon que l'ion divalent se trouve à l'intérieur ou l'extérieur de l'espace délimité par les deux chromophores d'une même molécule.

L'acétylation des $OH_{2-2'}$ est plutôt en faveur d'un type de fixation externe. En effet, le pigment diacétylé dans ces positions (Di Ac Rg) ne forme pas de polychélate avec les ions divalents, probablement par suite d'empêchement stérique dû aux groupements acétyles (BOUHET et al, b).

Le modèle de polychélate ainsi construit (Figures 52,53,54) révèle une structure ordonnée en hélice de pas 27 Å environ, et présentant quatre molécules de pigment par tour.

L'angle formé par les axes Y'_1Y_2 des chromophores voisins de deux molécules successives est d'environ 60°. L'angle formé par les axes $Y_1Y'_1$ des deux chromophores d'une même molécule étant de 30°, par addition des valeurs angulaires on retrouve le chiffre de 4 monomères par tour d'hélice .

Le pas (27 Å) de l'hélice du modèle est compatible avec l'hypothèse d'un empilement compact de chromophores au sein du polychélate. De la valeur (3,4 Å) de la distance minimum entre deux chromophores voisins empilés au maximum, déduite de l'analyse de l'effet excitonique, on retrouve la valeur de 27,2 Å (= 4 x 2 x 3,4 Å) pour le pas de l'hélice.

L'examen des modèles fournit encore les paramètres suivants :
- distance entre ions magnésium vicinaux ~7-7,5 Å
- diamètre extérieur de l'hélice ~20 Å
- distance des ions Mg^{++} à l'axe de l'hélice ~3,7 Å

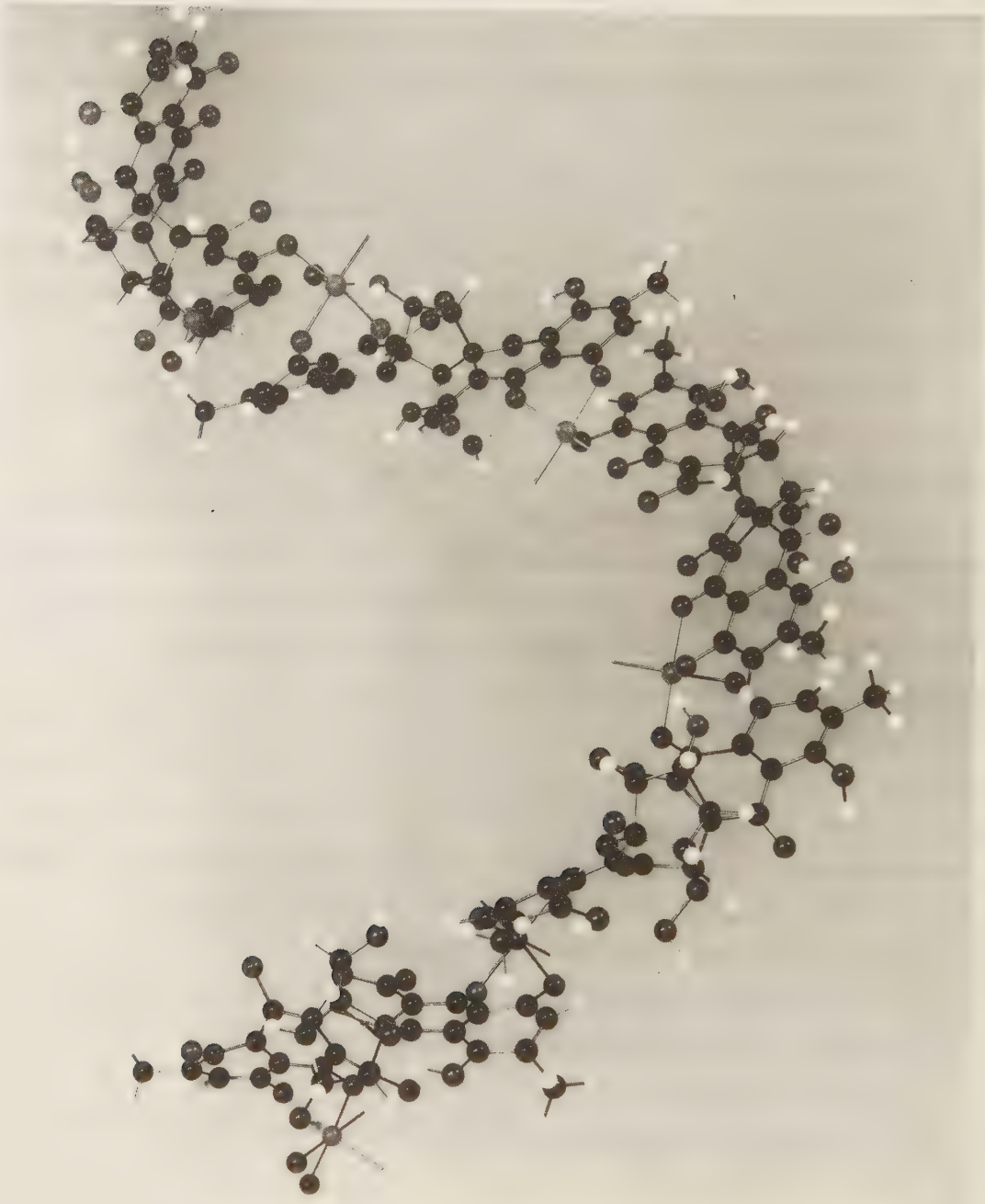


FIGURE 52 a) - Photographie du modèle éclaté (modèle BEEVERS) de polychélate de Lutéoskyrine (hélice droite). Vue de profil d'un segment à 5 monoméres.

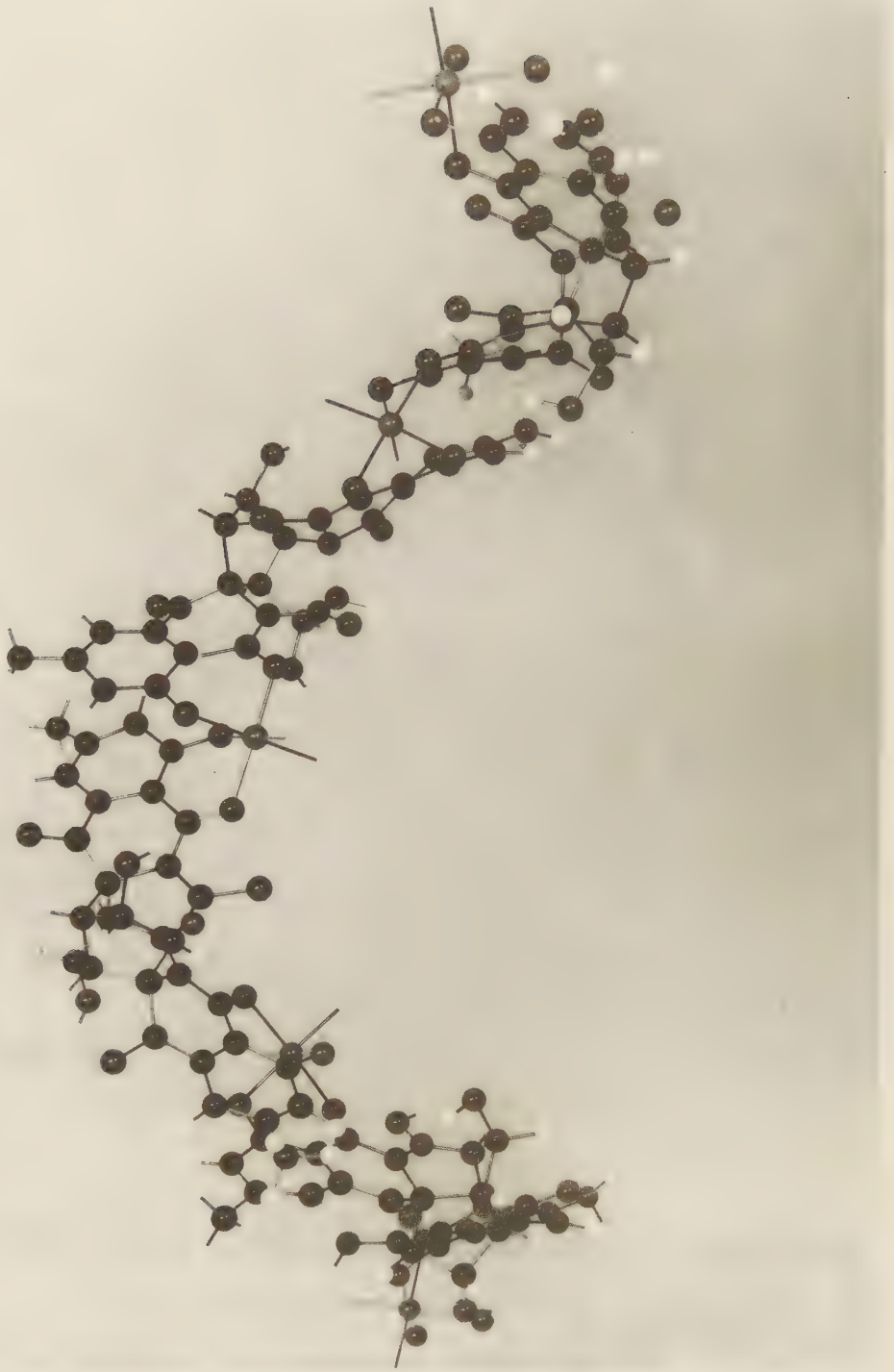


FIGURE 52 b) - Photographie du modèle (BEEVERS) de polychélate de Rugulosine (hélice gauche). Vue de profil d'un segment à 4 unités monomériques.

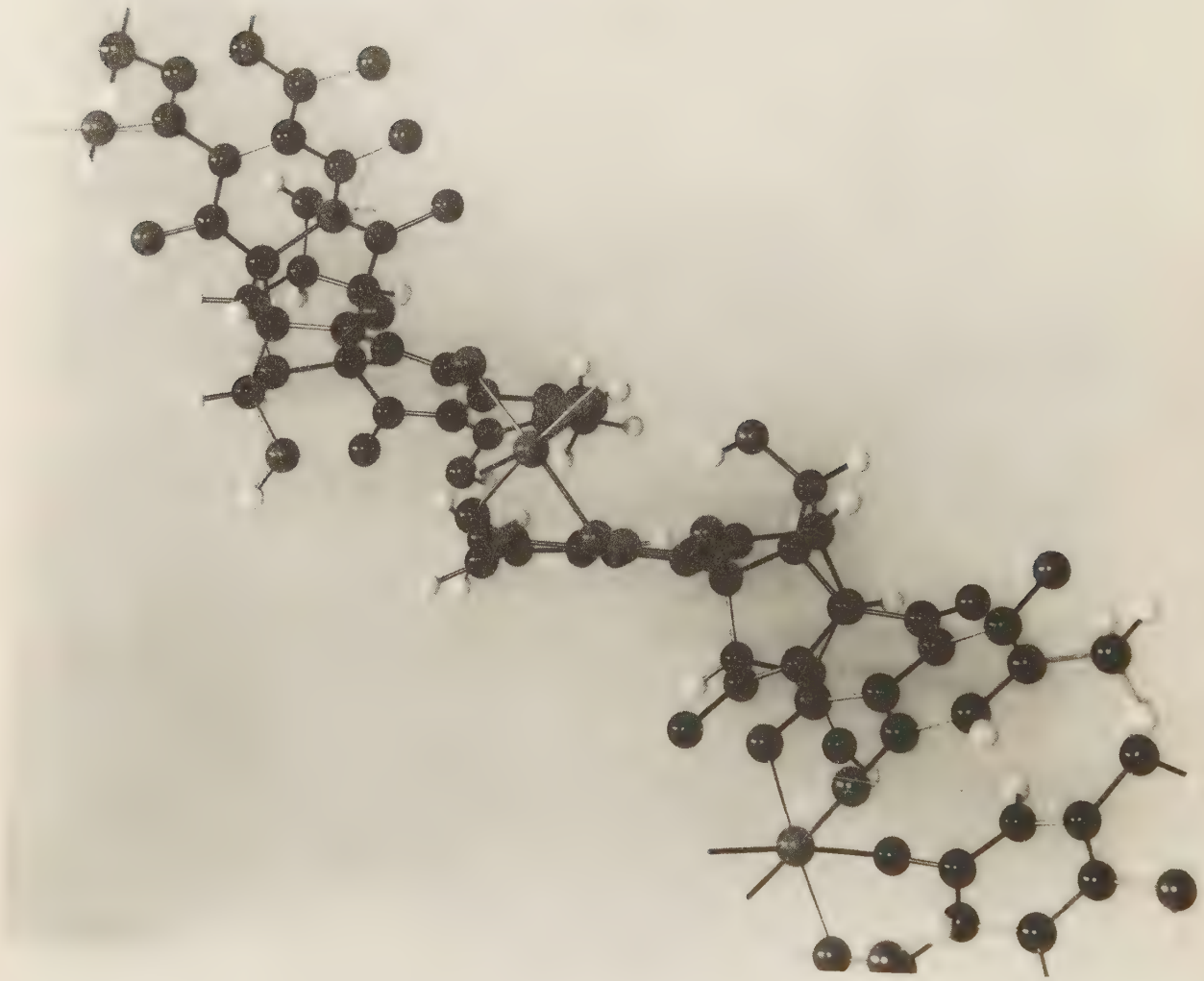


FIGURE 52 c) - Polychélate de Lutéoskyrine (modèle BEEVERS). Photographie de profil montrant le recouvrement à faible distance des parties coplanaires des chromophores de 2 monomères voisins liés par l'ion divalent.

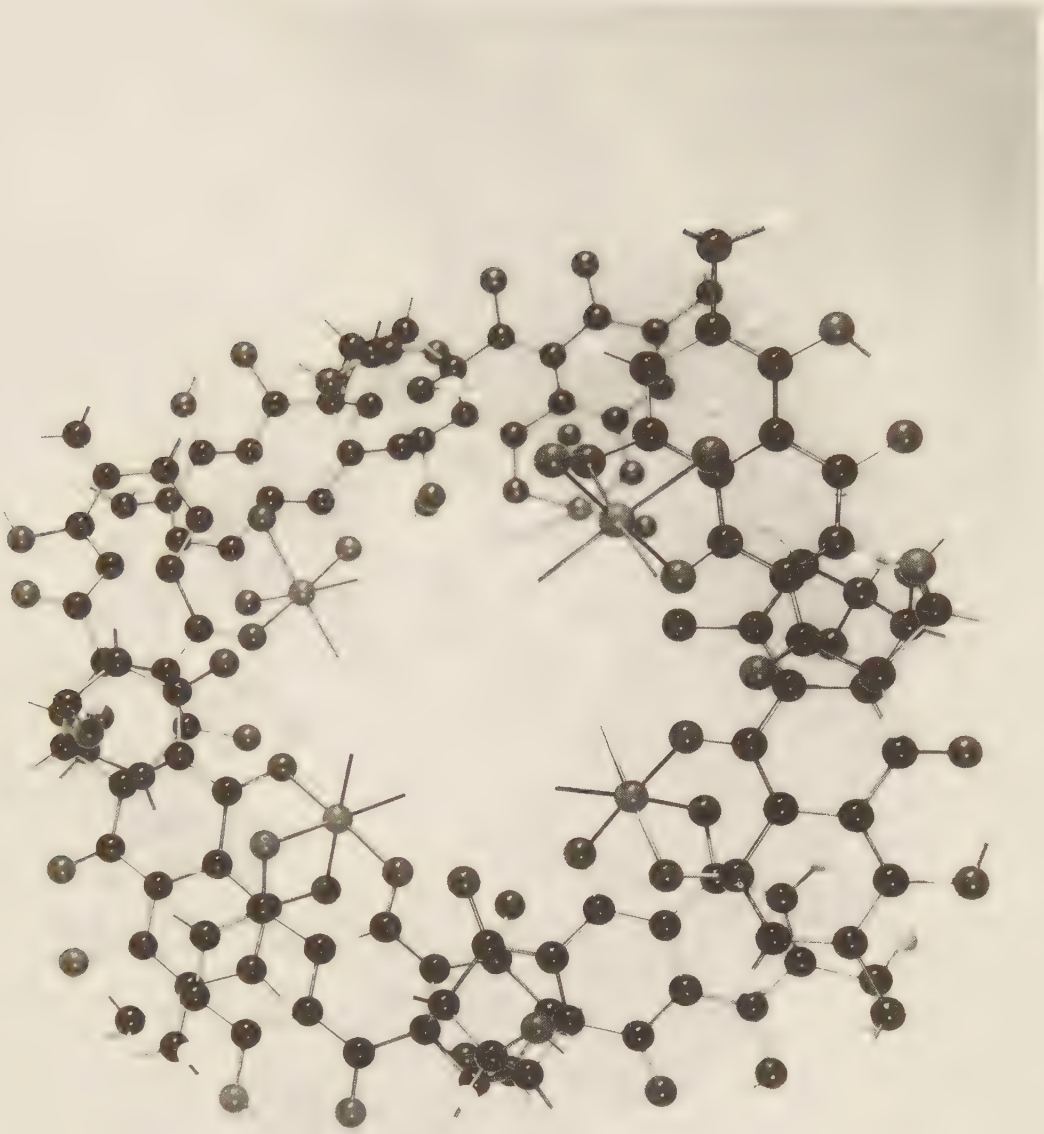


FIGURE 52 d) - Polychélate de Lutéoskyrine (modèle BEEVERS). Hélice droite vue de dessus. Noter la présence de 4 ions M^{++} par tour.

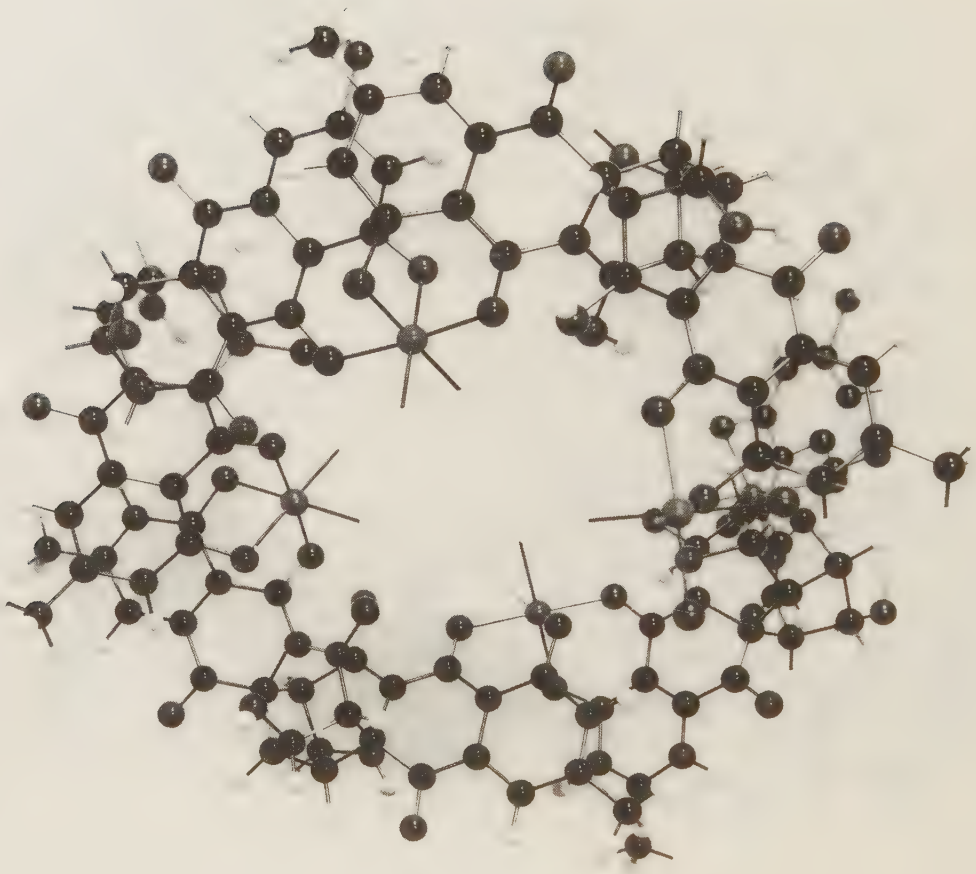


FIGURE 52 e) - Polychélate de Rugulosine (modèle BEEVERS).
Hélice gauche vue de dessus. Noter la présence de 4 ions M^{++} par tour.

FIGURE 52 f) - Photographie du modèle compact (modèle CPK)de polychélate de Lutéoskyrine. Vue externe de profil d'un segment d'hélice droite à 4 unités monomériques. Les ions Mg^{++} sont figurés par des cubes perçés de trous circulaires.

FIGURE 52 g) - Polychélate de Lutéoskyrine (modèle CPK).
Vue interne de profil. On remarque les 4 atomes de Mg^{++} correspondant aux 4 monomères de pigment du segment photographié.

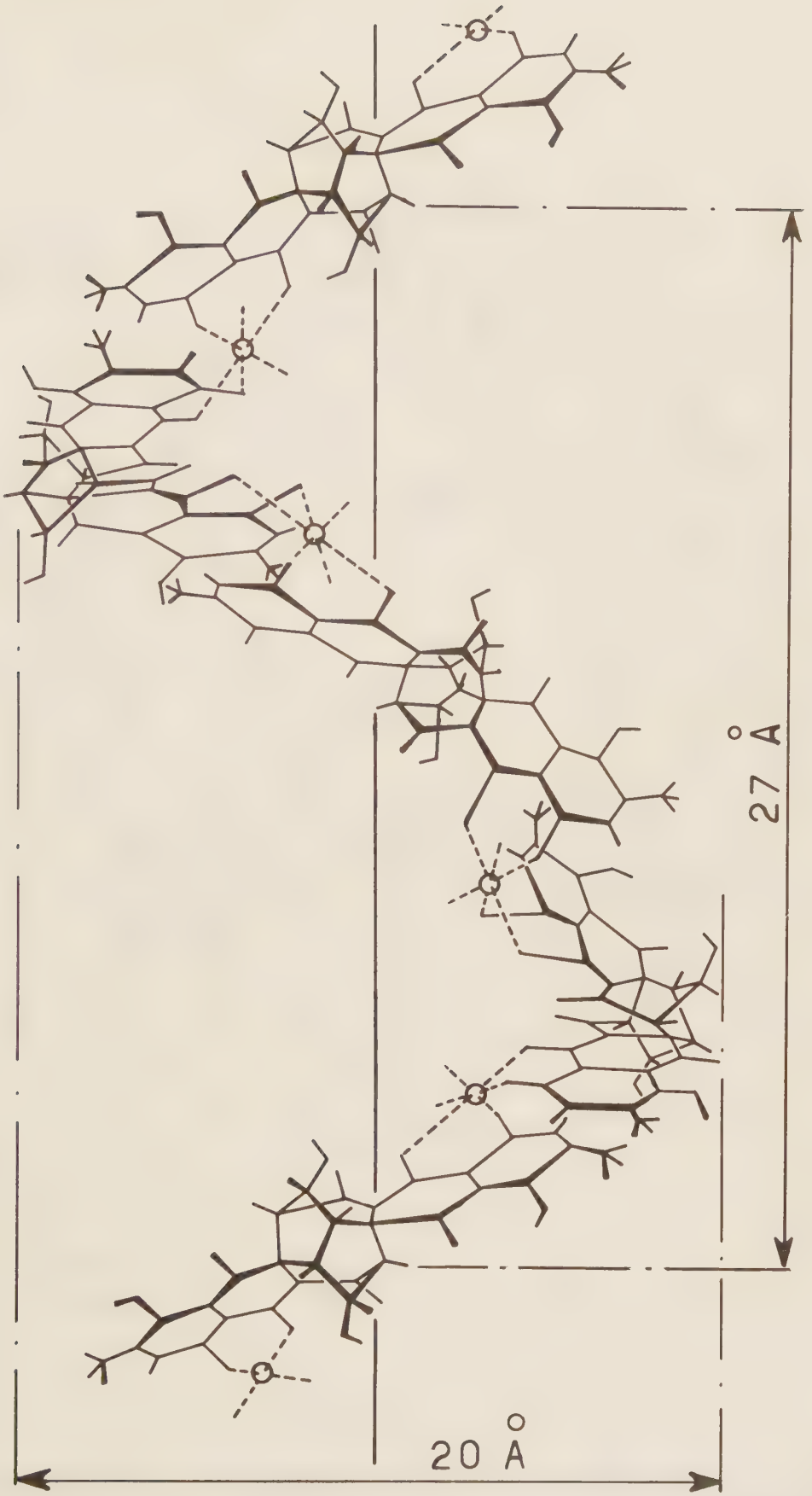


FIGURE 53 - SCHEMA DU MODELE DE POLYCHELATE Ls-(Mg-Ls)$_n$-Mg
(vue de profil)

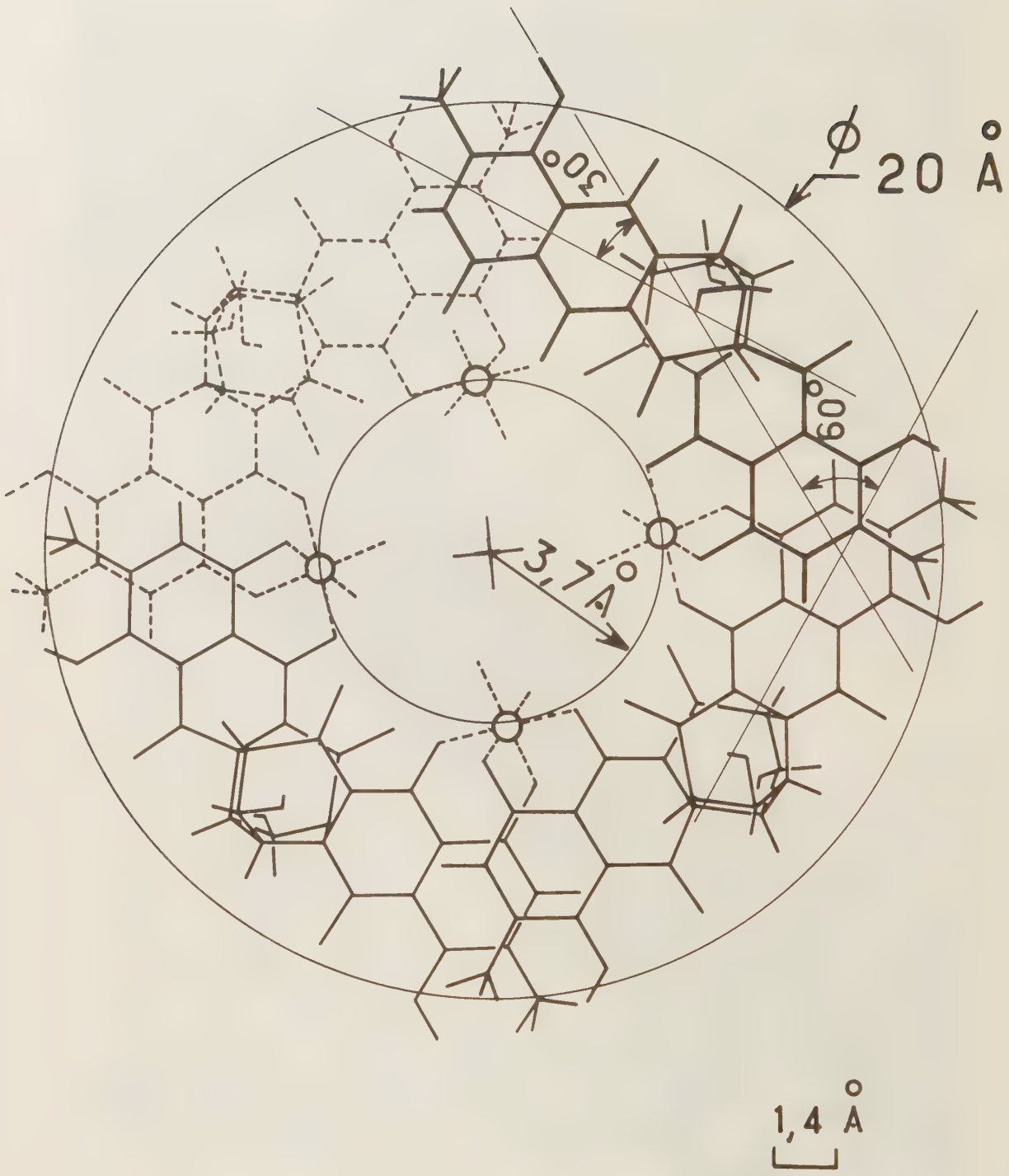


FIGURE 54 - SCHEMA DU MODELE DE POLYCHELATE Ls-(Mg-Ls)$_n$-Mg
(vue de dessus)

3ème PARTIE

ETUDE DES COMPLEXES TERNAIRES

[PIGMENT-ION DIVALENT-ACIDE NUCLEIQUE]

3ème PARTIE - CHAPITRE I

STRUCTURE ET SITES DE FIXATION DES ACIDES NUCLEIQUES.

-:-:-:-:-

Avant d'aborder l'étude des interactions entre les pigments et les acides nucléiques en présence d'ions divalents, nous rappellerons brièvement les données essentielles concernant la structure des acides nucléiques.

1) Structure des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont des polymères linéaires formés de nucléosides (base + sucre) monophosphates associés par des ponts 3'-5' phosphodiesters.

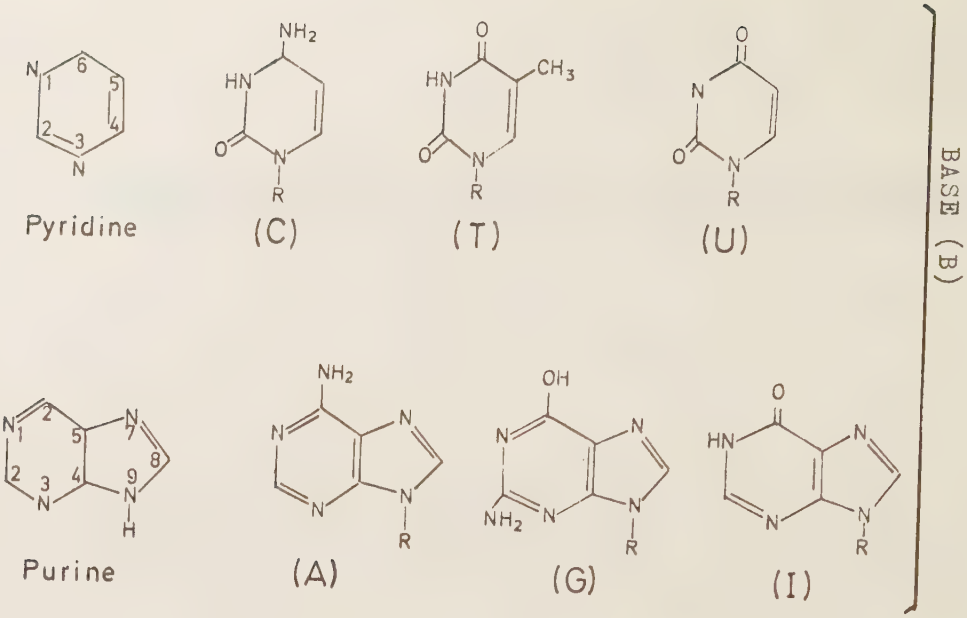
Les bases sont des dérivés de substitution de pyrimidine [cytosine (C), thymine (T), uracile (U)] et de purine [adénine (A), guanine (G), inosine (I)] (Fig. 55)

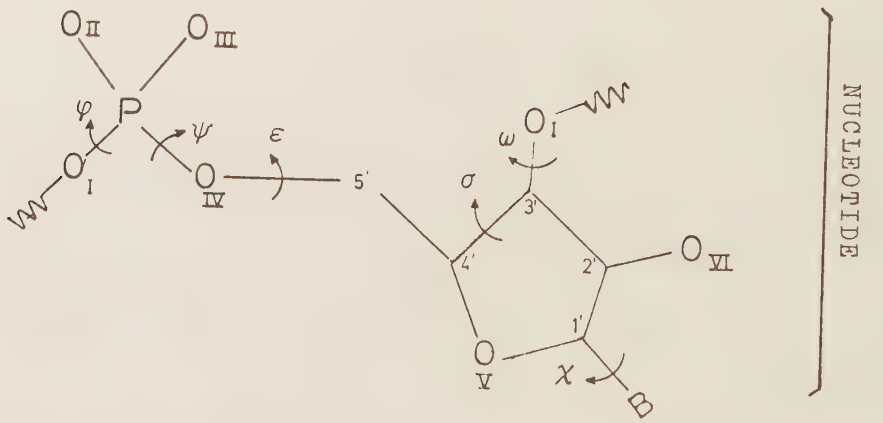
La nature du sucre (ribo en désoxyribo-β-furanose) permet de distinguer un acide ribonucléique (ARN) d'un acide désoxyribonucléique (ADN).

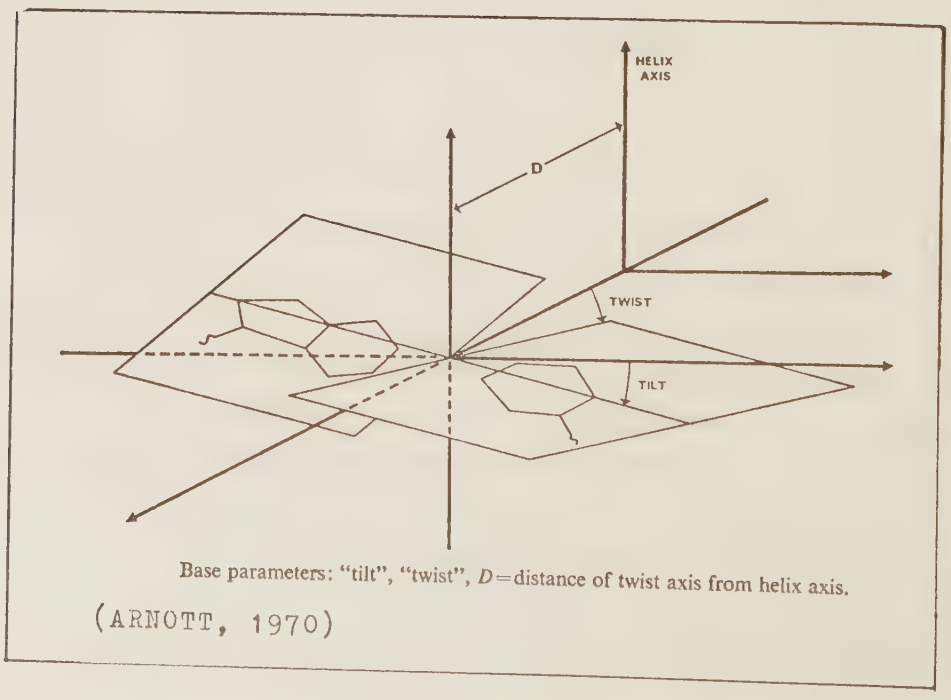
Les chaînes d'acides nucléiques peuvent, soit exister sous forme de monobrin (AN1), soit s'apparier par liaison hydrogène entre les bases complémentaires de deux chaînes antiparallèles pour former une hélice à deux brins (AN2).

Dans le cas des hélices doubles, les études cristallographiques des fibres ont permis de déterminer les paramètres conformationnels dont certains figurent dans le tableau 5 . En solution les acides désoxyribo et ribonucléiques auraient respectivement la conformation B-ADN et A-ARN ou A'-ARN (BRAM, 1971a et b). L'hybride de transcription ADN-ARN serait dans la conformation A-ADN (MILMAN et al 1967, ARNOTT et al 1973). Les hélices doubles de ribo homopolymères appariés : poly(A).poly(U) et

FIGURE 55 -







Base parameters: "tilt", "twist", D=distance of twist axis from helix axis.

(ARNOTT, 1970)

TABLEAU 5

Paramètre \ Acide nucléique	A-ADN (1)	B-ADN (2)	A-ARN (3) [Poly(A). Poly(U)]	A'-ARN (4) [Poly(I). Poly(C)]
Pas de l'hélice	28,2 Å	33,7 Å	30,9 Å	36 Å
Nombre de résidus par tour (n)	11	10	11	12
*Translation	2,56 Å	3,37 Å	2,81 Å	3,00 Å
Rotation	32,7°	36°	32,7°	30°
Inclinaison (Tilt)	20°	-2°	16°	10°
Torsion (Twist)	- 8,0°	5,0°	- 6,9°	-7,6°
Distance D	4,25 Å	0,5 Å	4,34 Å	4,5 Å
Distance P	8,84 Å	9,05 Å	8,91 Å	9,68 Å
Conformation du sucre	C_3'-endo	C_3'-exo	C_3'-endo	C_3'-endo

(1) FULLER et al 1965, SUNDARALINGAM et JENSEN 1965

(2) LANGRIDGE et al 1960, ARNOTT et HUKINS 1973

(3) ARNOTT et al, 1967 et 1973

(4) DAVIES et RICH 1958, ARNOTT 1970, ARNOTT et al 1973

*- Translation : projection sur l'axe de l'hélice de la distance entre deux bases successives.

- Rotation : angle de rotation des deux bases successives(360°/n)

- Inclinaison, torsion, distance D : paramètres définis dans la Fig. 55 (d'après ARNOTT, 1970). Les deux bases appariées par liaisons H font entre eux un certain angle (torsion) et forment un "plateau" plus ou moins incliné par rapport au plan horizontal (inclinaison). Sauf dans le cas de B-ADN, l'axe de l'hélice est extérieur au plateau des bases (distance D).

- Distance P : distance de l'axe de l'hélice au phosphore.

- Conformation du sucre : le carbone 3' du sucre peut être dirigé du côté du groupe C_5,O (endo) ou du côté opposé (C_3'-exo).

poly(I).poly(C), ont, à faible force ionique, la conformation A-ARN. A force ionique élevée, alors que le premier polymère forme une hélice triple (MASSOULIE, 1968), le second prend la conformation A'-ARN à l'état fibreux (ARNOTT et al, 1973) et en solution (BRAM, 1971 c).

Dans le cas des hélices monocaténaires, ces structures sont moins bien définies. Nous rappellerons ici seulement les structures à pH neutre.

Le poly(A) possède une structure hélicoïdale obtenue par empilement des bases. Cette structure a été mise en évidence par spectroscopie d'absorption UV et de dichroisme circulaire (BRAHMS 1963, Van HOLDE et al 1965, WARSHAW et al 1965), par diffusion centrale des rayons X (WITZ et LUZZATI, 1965) et par des études hydrodynamiques (EISENBERG et FELSENFELD, 1967). Le degré d'empilement mesurable en solution aqueuse est maximum à 0°C et diminue avec l'augmentation de la température (0°C à 60°C) (Van HOLDE et al, 1965 , HELMKAMP et TS'O 1962). L'effet de la force ionique (1 mM - 1 M NaCl sur l'empilement des bases est négligeable (LENG et FELSENFELD, 1966).

La structure du poly(I) dépend par contre de la force ionique de la solution. Pour des concentrations en NaCl inférieures à 0,1 M, le poly(I) possède une structure monocaténaire, dont les bases sont plus ou moins empilées (BRAHMS et SADRON 1966, SARKAR et YANG 1965). Pour des concentrations supérieures il y a formation d'une structure hélicoïdale multibrin, composée probablement de quatre brins parallèles (THIELE et GUSCHLBAUER 1973, ARNOTT et al 1974).

Le poly(G) possède une structure secondaire très stable (entre 20°C et 100°C) même à faible force ionique (0,01 M NaCl) (FRESCO et MASSOULIE 1963, POCHON et MICHELSON 1965, MILES et FRAZIER 1964). Il se formerait une hélice à quatre brins dont les bases seraient reliées par liaison hydrogène (N_1-H-N_7) (CHANTOT et al, 1974).

Le poly(C) présente une structure en hélice simple dont les bases sont empilées comme dans le cas du poly (A) (HELMKAMP et TS'O 1962, BRAHMS 1963, FASMAN et al 1964).

Le poly(U) est complètement dépourvu de structure organisée à des températures supérieures à 15°C (RICHARDS et al, 1963). A basse température ($< 5°C$) ce polymère formerait des hélices doubles en "épingle à cheveux" (THIERR et al, 1971).

Pour une revue plus détaillée des propriétés physicochimiques des polynucléotides synthétiques on peut se référer à l'article de MICHELSON et al (1967).

2) Sites potentiels de fixation d'un ligand sur les acides nucléiques.

a - Cas des acides nucléiques bicaténaires (AN2)

Un ligand peut se fixer sur l'acide nucléique (AN2)

- soit au niveau des groupes phosphates qui se trouvent dans la région périphérique de la double hélice. Ces groupes phosphates chargés négativement (PO_4^-) à pH > 2 peuvent fixer les cations ou les molécules chargées positivement (colorants cationiques et polyamines par exemple, FELSENFELD et HUANG 1959 et 1960).

- soit au niveau des bases puriques ou pyrimidiques. On sait que les bases de l'ADN, appariées selon le modèle de Watson-Crick (Fig. 56), définissent une structure en double hélice comportant un grand et un petit sillon. Dans le grand sillon les sites potentiels de fixation d'un ligand sont les groupes : N_7 des purines, l'hydrogène libre du groupe NH_2 en 6 de (C) ou (A) et un doublet libre du C=O en 6 de (T) ou (G). Dans le petit sillon les sites correspondants sont le N_3 des purines, le CO en 2 de (C) et l'hydrogène libre du groupe NH_2 en 2 de (G). La fixation du ligand sur l'un de ces sites ne modifie pas la structure bihélicoïdale de l'ADN et constitue la première possibilité de fixation aux bases.

On sait également que la structure de l'ADN n'est pas figée mais dynamique c'est à dire que les liaisons hydrogènes entre les couples de bases se font et se défont continuellement

(il existe un échange de 5.10^6 hydrogènes/sec./paire de nucléotides, Mc CONNEL et Von HIPPEL, 1970). Ces groupements éventuellement non liés par ce type de liaison hydrogène peuvent constituer une deuxième possibilité de sites potentiels de fixation (cas de Ag^+, par exemple selon JENSEN et DAVIDSON, 1966).

Une troisième possibilité de fixation est celle d'un couplage dipolaire (Van der Waals-London) entre un ligand polaire ou polarisable et la base Pu ou Py considérée dans son ensemble. Les molécules s'associant de cette façon se classent en deux catégories :

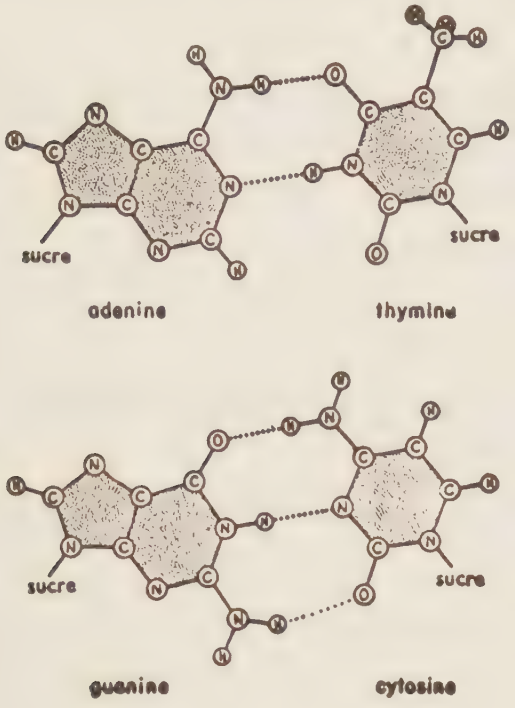
- les molécules planes qui s'intercalent entre deux paires de bases successives (LERMAN, 1963 et 1964 par exemple) provoquant une détorsion locale et un allongement de la double hélice (FULLER et WARING 1964, CRAWFORD et WARING 1967, LE PECQ 1967 et 1971). Ce mode de fixation augmente la stabilité thermique de l'ADN.

- les ions dipolaires tels que les anions CCl_3COO^-, $CClO_4^-$ en concentration saline élevée (HAMAGUCHI et GEIDUSCHEK 1962, Mc CONNELL et Von HIPPEL 1970) ou les cations comme Cs^+, Hg^+ (DOPPLER-BERNARDI et DAUNE, 1969). Ces complexes modifient la solubilité et déstabilisent la double hélice.

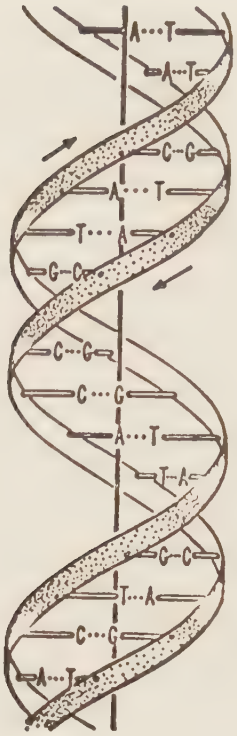
Nous devons finalement remarquer que la fixation d'un ligand peut résulter des différents modes de liaisons mentionnés ci-dessus existant simultanément. Nous en citerons deux exemples :
1) l'ion divalent Mn^{2+} qui se fixe, soit seulement sur les groupes phosphates, soit à la fois sur un groupe phosphate et sur un groupe N_7 de la purine voisine (modèle c de la Fig. 56)
2) l'actinomycine qui s'associe à l'ADN par plusieurs liaisons : le chromophore phénoxazone central s'intercale entre les paires (G)-(C) et se lie par son groupement aminé en 2 à l'oxygène soit d'un sucre, soit d'un groupe phosphate voisin. Les peptides cycliques latéraux se fixant sur le petit sillon de l'ADN par des liaisons H (HAMILTON et al 1963, REICH et GOLDBERG 1964, MULLER et CROTHERS 1968, SOBELL 1972).

FIGURE 56 -

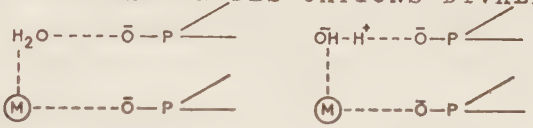
APPARIEMENT DES BASES
SELON WATSON-CRICK

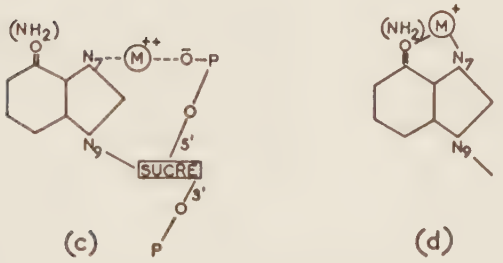


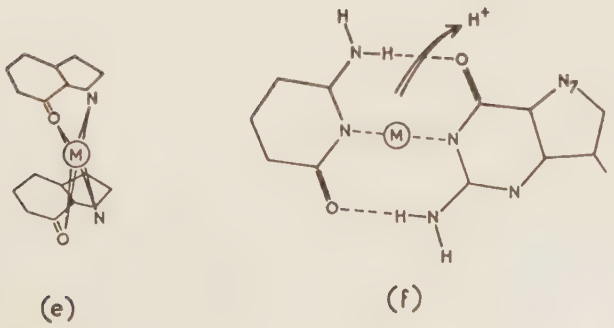
SCHEMA DE LA DOUBLE HELICE



MODELES DE FIXATION DES CATIONS DIVALENTS







b - Cas des acides nucléiques monocaténaires (AN_1)

Les sites de fixation sont les mêmes que ceux de la double hélice. En outre, par suite du non appariement des bases, les groupes NH_2 , NH , N et C=O sont libres et accessibles aux molécules extérieures. La molécule d'AN_1 est d'autre part moins rigide que celle d'AN_2 , les forces d'interactions verticales étant les seules à maintenir une certaine structure hélicoïdale. On peut donc distinguer deux types de fixation :

- soit une interaction ionique avec les groupes phosphates et/ou les groupes NH_2, NH , N , O des bases

- soit un couplage dipolaire entre la molécule intercalée entre les bases de l'acide nucléique.

3ème PARTIE - CHAPITRE II

ETUDE DU COMPLEXE II:(Pigment-ion divalent-AN_2).

-:-:-:-:-:-

1) Rappel des études antérieures sur le complexe II

L'existence d'un complexe entre la lutéoskyrine et l'ADN de thymus de veau en présence de $MgCl_2$ a été mise en évidence pour la première fois au laboratoire par UENO, PLATEL et FROMAGEOT (1966). Le complexe II formé est soluble aux pH physiologiques ; les études sur des solutions aqueuses de (Ls + ADN + $MgCl_2$) en absorption visible, ont fourni la stoéchiométrie : Mg/Ls = 1, ADN/Ls = 1,5 à 3,0. Les conditions de solubilité ont pu être précisées : Mg/Ls doit être supérieur à 1 et ADN/Ls $\geq$2. Dans ces conditions de solubilité, l'existence du complexe Ls.ADN était encore prouvée par plusieurs expériences :

a - Après centrifugation d'un mélange (Ls + ADN + Mg , 1 + 7 + 2) à 100 000 g pendant 80 minutes, la densité optique diminue de 95% dans le visible et de 58% dans l'UV alors que celle d'un témoin (ADN + Mg) ne baisse que de 27%. Cette expérience montre que l'ADN sédimente avec le pigment.

b - De même, lors de la centrifugation sur gradient de saccharose (5 à 20 %) d'un mélange de (Ls + ADN + $MgCl_2$) on recueille 2 fractions sédimentant l'une rapidement, l'autre lentement. La première contient de la Ls et de l'ADN, la seconde contient l'ADN résiduel non complexée sédimentant à la même vitesse que l'ADN témoin.

c - Par filtration sur gel G25 du mélange (Ls + ADN + $MgCl_2$) (Mg/Ls = 1, ADN/Ls = 1,2 à 4,9) seul l'ADN libre migre et la quantité filtrée est inférieure à celle du contrôle ADN sans $MgCl_2$;

Le complexe Ls-ADN-Mg coloré en jaune reste au sommet de la colonne, les proportions Ls/ADN du complexe variant de 0,67 à 2,7 selon les concentrations initiales d'ADN utilisées.

D'après ces expériences, la distribution des molécules de pigments sur l'ADN ne devrait pas être statistique. Les auteurs proposaient un modèle de fixation coopératif du pigment sur les groupements phosphate de l'ADN par l'intermédiaire des ions Mg^{++}. Les unités de Ls-Mg liées d'abord isolément de façon statistique aux groupes phosphates se localiseraient secondairement en des zones données de l'ADN et s'empileraient de façon à former une troisième hélice compacte autour de la double hélice. Maintenant que l'on connait les modalités d'association linéaire des molécules de lutéoskyrine liées par les ions divalents (voir 2ème partie) on constate une incompatibilité entre le pas de l'hélice des acides nucléiques bicaténaires et celui de l'hélice du polychélate. La question se pose donc de savoir : si la lutéoskyrine se trouve associée dans le complexe II de la même manière que dans le polychélate ?

2) Analogies spectrales entre le complexe II et le polychélate

a - Absorption et dichroisme circulaire

- Les spectres d'absorption à l'instant initial et après 15 jours d'incubation à 20°C des complexes II formés en mélangeant la lutéoskyrine, les acides nucléiques bicaténaires et le $MgCl_2$ sont représentés dans la figure 57. Les spectres (à l'exception de ceux du complexe Ls-Mg-Poly(I).Poly(C) évoluent lentement en fonction du temps vers ceux du polychélate (Ls-Mg) (voir Fig. 25).

- Les spectres de dichroïsme circulaire de ces mêmes mélanges enregistrés après 2 à 4 heures (à 20°C) et représentés dans la fig. 58) sont peu modifiés après une attente de dix jours (à 20°C) et une incubation supplémentaire de 2 heures à 37°C. L'intensité des bandes excitoniques du complexe II avec [Poly(G). Poly(C)] bien formé après 4 heures (20°C) n'évolue plus, alors que celles des complexes avec poly(A).poly(U) ou ADN de thymus de veau augmentent légèrement (facteur 2,2 et 1,2 respectivement).

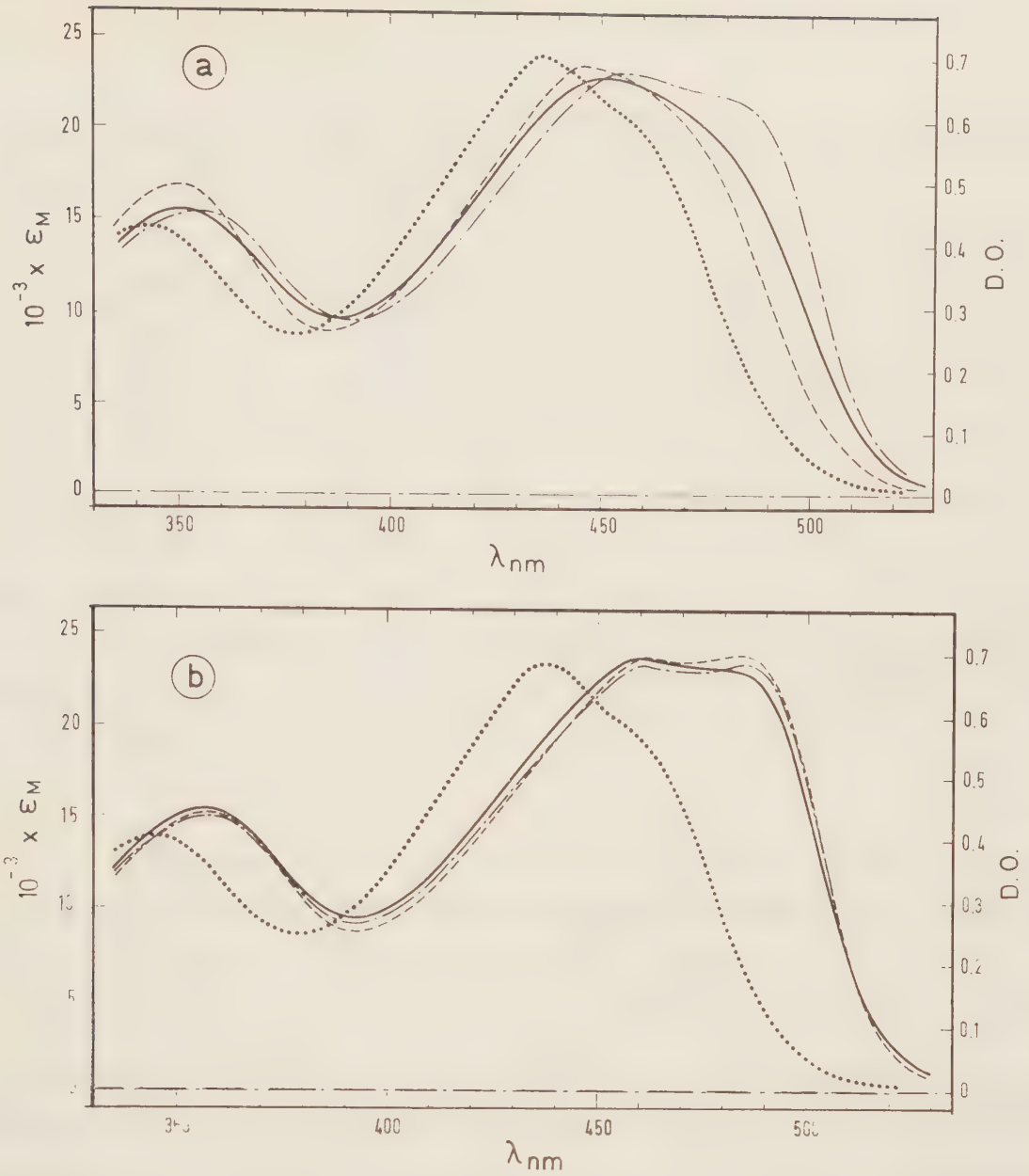


FIGURE 57 - SPECTRES D'ABSORPTION DE (Ls+ AN_2+$MgCl_2$)

Les spectres sont enregistrés (Cary 14) 30 mn après mélange des réactifs (a) ou après 15 j à 23°C (b). La densité optique (D.O) mesurée est reportée sur l'échelle de droite, le coefficient d'extinction molaire (ε_M) sur l'échelle de gauche.

Les solutions sont préparées en ajoutant dans le tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,4) dans l'ordre : pigment, acide nucléique, $MgCl_2$. Les concentrations finales utilisées sont :

C_{Ls} = 0,0295 mM , C_{MgCl_2} = 1 mM,

——— ADN de thymus de veau-(0,176 mM)

– – – Poly(A).Poly(U) - (0,136 mM)

– . – Poly(G).Poly(C) - (0,140 mM)

····· Poly(I).Poly(C) - (0,140 mM)

(voir aussi légendes Fig. 58).

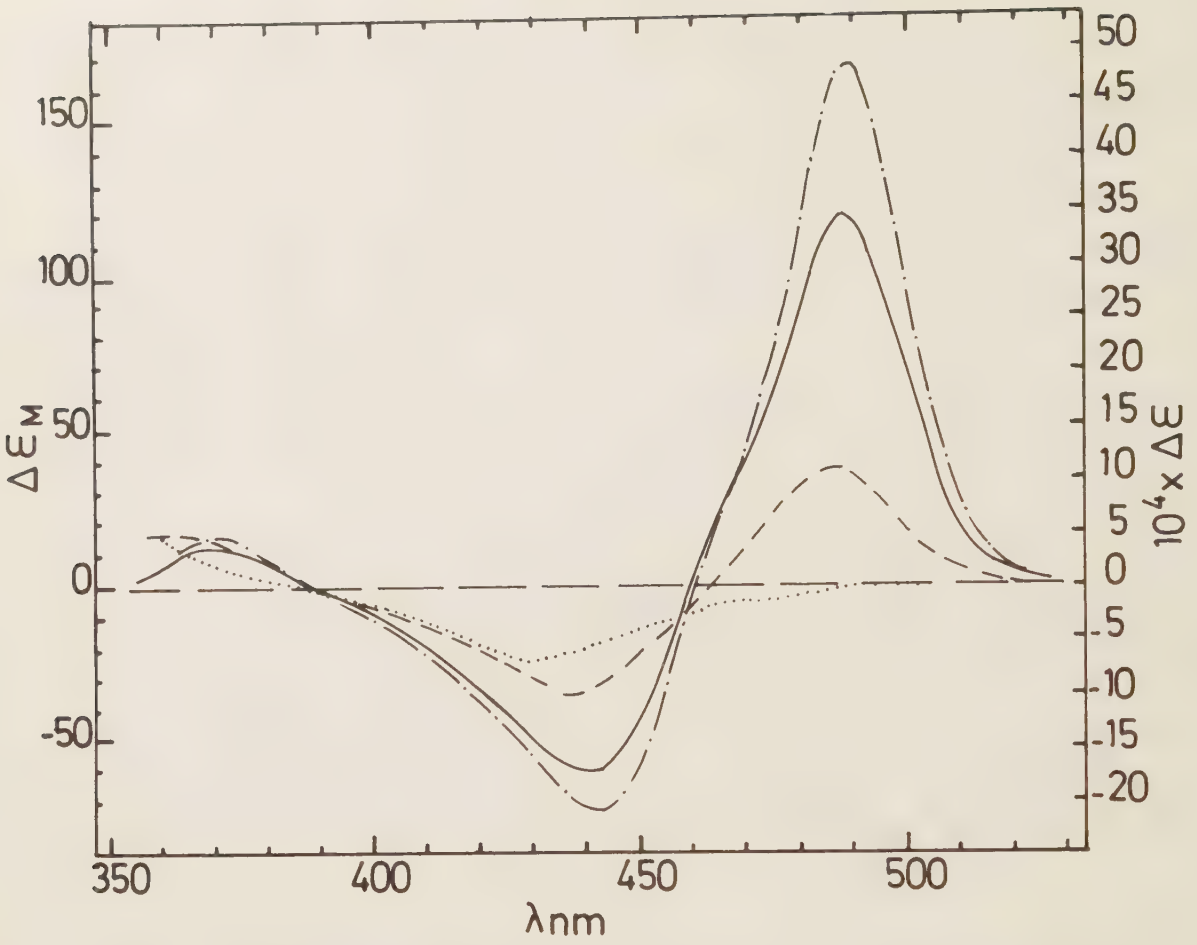


FIGURE 58 - SPECTRES DE DICHROISME CIRCULAIRE DE ($Ls+AN_2+MgCl_2$)

Les spectres sont enregistrés à l'aide d'un dichrographe (Jouan-modèle II).

$\Delta\varepsilon$ (échelle de droite) désigne l'amplitude ($\varepsilon_G-\varepsilon_D$) mesurée pour C_{Ls} = 0,0295 mM

$\Delta\varepsilon_M$ (échelle de gauche) représente la valeur du coefficient molaire différentielle $(\varepsilon_G-\varepsilon_D)_M$ exprimé en $mole^{-1}.l.cm^{-1}$

(Autres légendes : voir Fig. 57)

L'ADN de thymus de veau est un don du Dr. Pouyet (Strasbourg). Les polynucléotides bicaténaires sont préparés en mélangeant des quantités équimolaires des polynucléotides monocaténaires (P.L. Biochemicals Inc.). Les biopolymères sont dialysés 3 fois contre la solution (tampon phosphate 0,01 M ; pH 7,4 + EDTA 1 mM) puis plusieurs fois contre le tampon d'utilisation).

Les concentrations des biopolymères sont calculées à partir des valeurs de ε_M de la littérature (Janik, 1971)

Comme en absorption, les spectres de DC obtenus sont typiquement analogues à ceux du polychélate Ls-(Mg Ls)$_n$-Mg.

Le cas du complexe avec Poly(I).Poly(C) a retenu plus particulièrement notre attention: les spectres d'absorption et de DC (fig.57,58) obtenus à partir de solutions équimolaires de Poly(I) et Poly(C) auxquelles on ajoute la lutéoskyrine (P/D $\simeq$ 4) puis un excès de $MgCl_2$ (Mg/Ls = 34) ressemblent à ceux du complexe I formé entre Ls et poly(I) (voir chapitre suivant). Par contre lorsque le $MgCl_2$ n'est ajouté qu'en petite quantité (Mg/Ls $\sim$ 1-2) le complexe I ne se forme plus et les spectres sont typiques du complexe II déjà observé avec l'ADN bicaténaire par exemple. Un excès de magnésium stabiliserait donc moins le complexe II que le complexe I et destabiliserait vraisemblablement en même temps la structure en double brin du Poly(I).Poly(C).

Les spectres d'absorption et de DC des complexes (rugulosine - acides nucléiques bicaténaires - ion divalent) représentés dans la fig.59 montrent un phénomène analogue. Notons que la caractérisation des complexes est plus facile en DC qu'en absorption. Contrairement au cas de la lutéoskyrine, le Poly(A).Poly(U) forme difficilement un complexe II avec le rugulosine en présence d'un excès de $MgCl_2$; la grande stabilité du complexe I (RG-Poly A) formé dans les mêmes conditions permet peut être d'expliquer le phénomène (voir Chapitre III).

b - RPE

Les spectres des solutions d'ADN de thymus de veau auxquelles on a ajouté du chlorure de manganèse (en concentration variable) obtenus à 20°C et à -150°C en milieu tampon (NH_4Cl/ NH_4OH 0,1 M pH 8,5) sont analogues à ceux d'une solution témoin de métal libre (6 raies hyperfines équidistantes à 20°C et une seule raie large (350 G à -150°C). Une légère diminution de l'intensité des raies spectrales par rapport au métal seul est en accord avec l'hypothèse de l'existence de 2 sites de fixation du Mn^{++}, l'un sur les phosphates (fixation labile), l'autre sur la base (fixation forte) (CLEMENT et al, 1973).

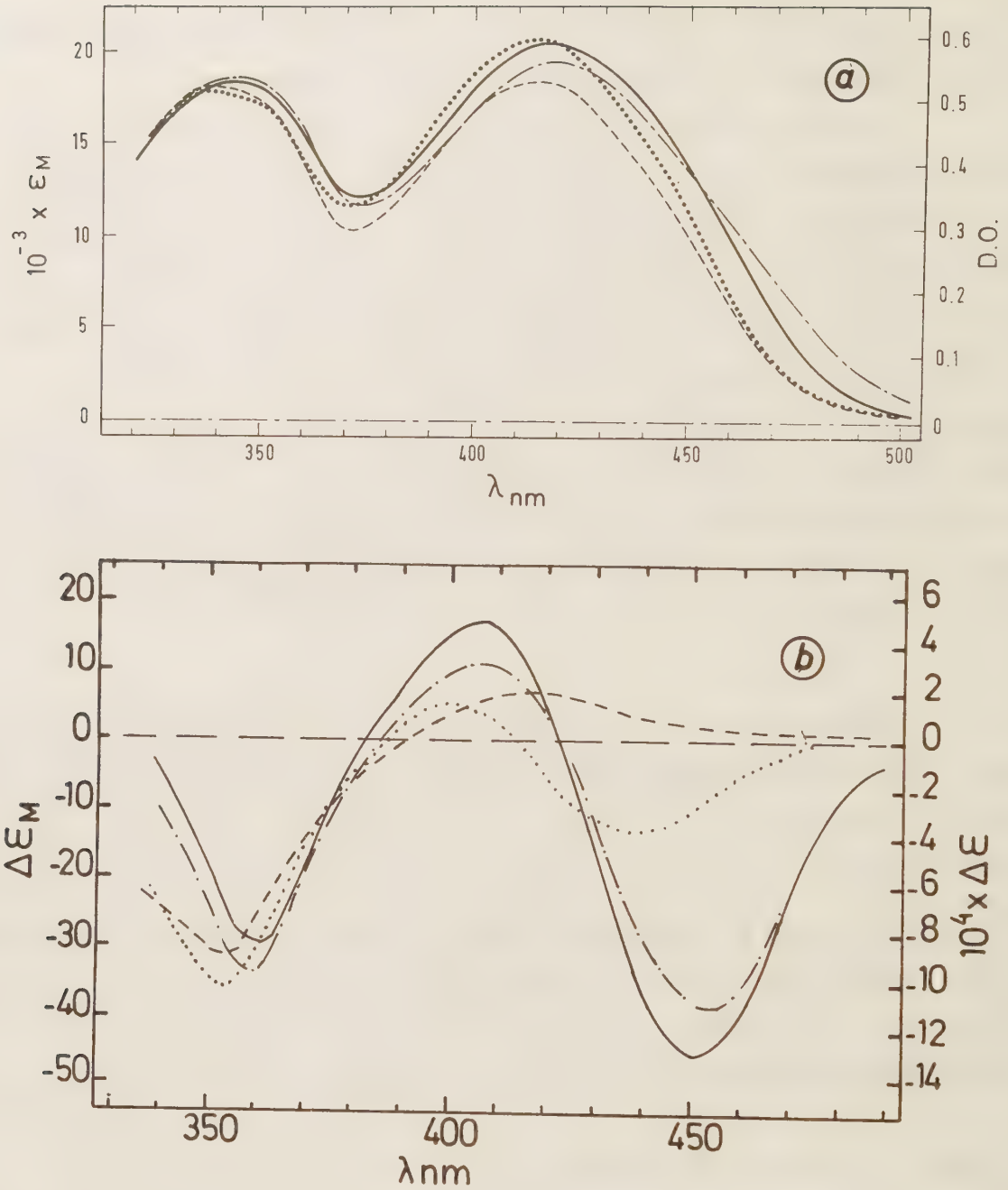


FIGURE 59 - SPECTRES D'ABSORPTION (a) et DE DICHROISME CIRCULAIRE (b) des solutions dans le tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,4) de

- rugulosine (0,029 mM),
- + acide nucléique bicaténaire :
  - ——— ADN de thymus de veau
  - - - - Poly(A).Poly(U)
  - -·-·- Poly(G).Poly(C)
  - ····· Poly(I).Poly(C)
- + $MgCl_2$ (1 mM)

En présence de lutéoskyrine et d'ADN, les ions Mn^{++} présentent à +25°C et -150°C une seule raie RPE (largeur 720 G) comme dans le cas du polychélate $(Ls\ Mn)_n$. La stoéchiométrie déterminée par l'addition de quantités croissantes de $MnCl_2$ à des solutions de Ls + ADN ($C_{Ls} \simeq 2$ mM , $Ls/ADN \simeq 4$) est de 1 comme pour le polychélate. La distance calculée à partir de la largeur de raie entre deux ions Mn_{II} voisins est la même (5,4 Å).

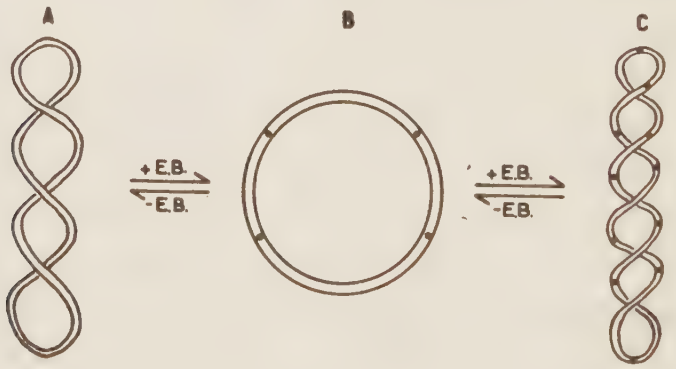
En conclusion, l'analogie étroite des spectres absorption, DC et RPE suggère que le complexe II résulte d'une adsorption du polychélate (pigment-ion) sur les groupes phosphates de l'ADN. Ce fait est encore confirmé par la mesure sur le modèle du polychélate de la distance (d) entre deux ions Mg^{++} voisins ($d \simeq 7$ Å), la valeur obtenue étant proche de celle de 2 groupes phosphates proximaux de l'ADN (WILSON, 1973).

Divers autres résultats expérimentaux confirment l'hypothèse de l'existence du polychélate dans le complexe II :
1) la cinétique de formation du complexe II est lente et comparable à celle de la formation du polychélate,
2) comme le polychélate, le complexe II est stable vis à vis de l'EDTA ($\frac{EDTA}{Mg} = 6$). Le complexe bien formé dans le tampon phosphate(pH 7,4 ; 0,1 M NaCl avec Mg/Ls = 20, P/D = 4) après incubation 12 heures à 37°C + 1 semaine à 4°C, n'est dissocié que de 10 % après addition d'EDTA et incubation à 20°C pendant 50 heures,
3) l'addition d'éthanol (60 % du volume final) à une solution de complexe II ($5 < P/Ls < 200$, Mg/Ls = 10 μ = 0,01 M, durée d'incubation 1 h 30 à 37°C) précipite l'ADN complexé au pigment. Le dosage par spectroscopie d'absorption visible ne permet pas de déceler plus de 1 à 5 % de lutéoskyrine monomère libre ou complexée au Mg^{2+} ou de polychélate néoformé en solution. Le précipité floconneux (ADN-pigment-Mg) très hétérogène présente des zones colorées en jaune brun séparées par des zones incolores. L'examen des fibres colorées par diffraction des rayons X ne révèle pas une structure définie du complexe ADN-pigment.

3) Etude de la viscosité

Le problème posé ici est de savoir si le complexe II résulte seulement d'une adsorption du polychélate formé sur l'ADN ou bien d'une intercalation supplémentaire même partielle du pigment polymérisé.

Une intercalation éventuelle du colorant peut être mise en évidence par une étude de la variation des propriétés hydrodynamiques (sédimentation, viscosité) d'une solution d'ADN circulaire (bihélicoïdal fermé) en fonction du rapport D/P, comme il a été montré par exemple à propos du bromure d'éthidium (BET) (CRAWFORD et WARING 1967, BAUER et VINOGRAD 1968, REVET et al 1971, Le PECQ 1971). Ce type d'ADN circulaire forme normalement une superhélice (conformation A de la figure ci-dessous). Par augmentation du nombre de molécules intercalées, la structure torsadée se relâche (forme B) et se tord de nouveau en sens contraire (superhélice C).



Superhélice A Forme relâchée B Superhélice C
(D'après LE PECQ, 1971)

D'après la figure 60 , l'intercalation du BET provoque une élévation importante de viscosité jusqu'à un maximum (correspondant à la forme B), alors qu'une fixation électrostatique simple d'un composé donné (l'hydroxystilbamidine par exemple)

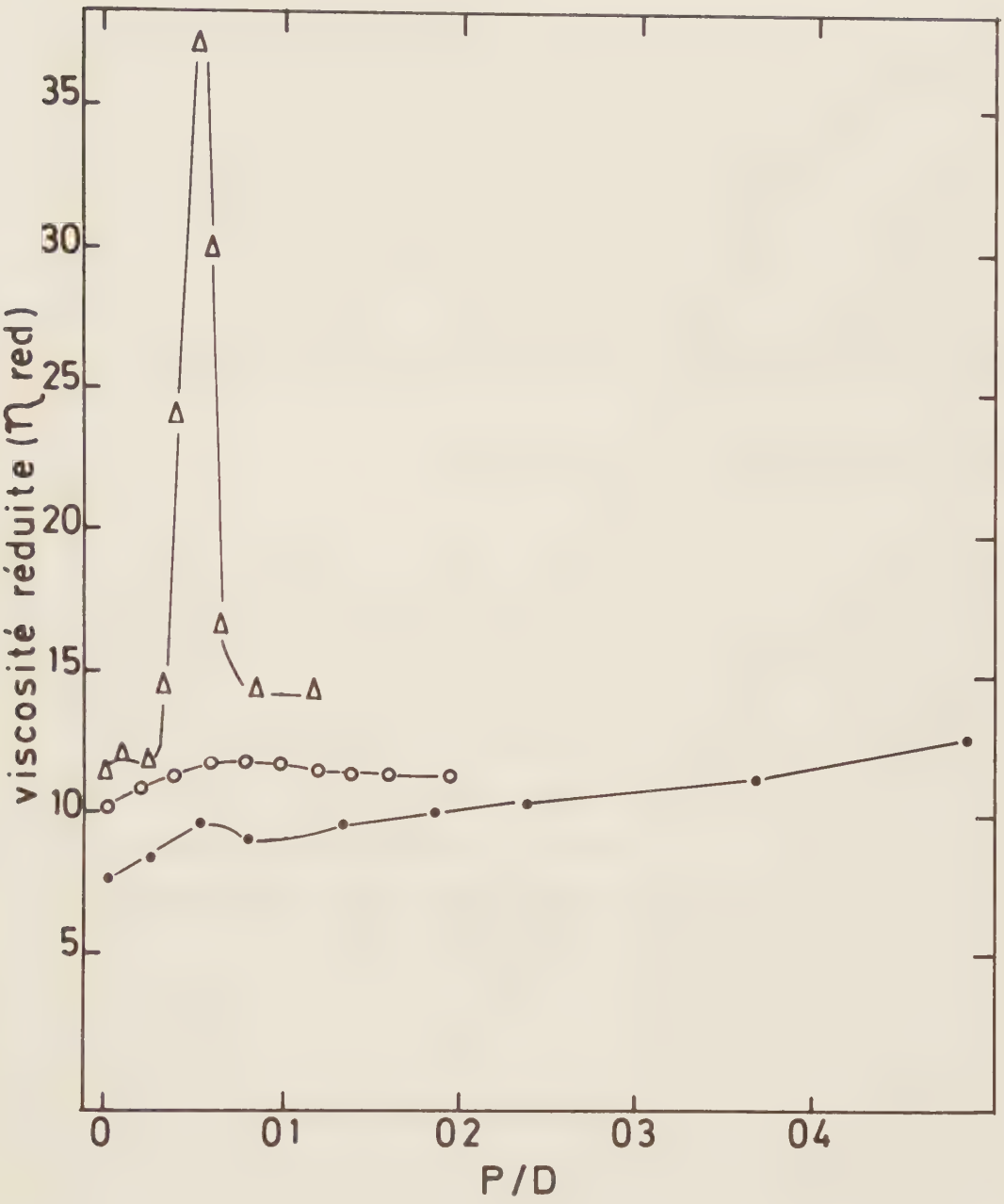


FIGURE 60 - VARIATION DE LA VISCOSITE REDUITE DE L'ADN CIRCULAIRE BIHELICOÏDAL FERME (Phage PM_2) en fonction du rapport ADN/pigment (P/D).

La variation de P/D est obtenue par additions successives de 15 µl de lutéoskyrine (2 mM) + 5 µl de $MgCl_2$ (0,1 M) à une solution d'ADN de phage PM_2 (1,4 ml à 0,3 M/L).

Les variations de viscosité réduite dans le cas du BET (-Δ-) et de l'hydroxystilbamidine (-o-) (FESTY et al, 1971) sont reportées à titre de comparaison.

entre les sillons de l'ADN ne modifie pas de façon significative la viscosité de l'ADN (FESTY 1971, FESTY et al 1971).

Dans les mêmes conditions, l'addition en quantité croissante de lutéoskyrine à une solution d'ADN circulaire du phage PM_2 (Le PECQ,1971) ne provoque qu'une légère augmentation de la viscosité provenant probablement d'un accroissement du volume du complexe II néoformé. L'expérience permet d'exclure en tous cas l'hypothèse d'une intercalation même partielle du pigment.

4) T_M de l'ADN engagé dans le complexe II

On peut se faire une idée du mode de fixation du polychélate sur l'ADN en étudiant l'influence de la température sur les solutions de complexe II : faisant l'hypothèse que le polychélate se fixe sur toute sa longueur en formant une superhélice autour de l'ADN, comme dans le cas des nucléohistones (BRAM, 1971 a), il devrait en résulter une stabilisation de la structure de l'ADN et un retard à la "fusion" thermique du biopolymère (OHBA, 1966). Par contre une fixation partielle sur un court segment d'ADN ne devrait pas changer sensiblement le T_M.

Nos résultats montrent (Fig. 61) que la complexation de la rugulosine provoque non pas une augmentation mais une légère diminution significative du T_M de l'ADN de thymus de veau et de l'ADN du phage T_7 (-3 à -5°C). Ce résultat, analogue à celui trouvé (déstabilisation de 4°C) pour le complexe II (Ls-Mg-ADN de thymus de veau) (UENO et al, 1968), permet d'exclure le modèle de fixation totale en superhélice. Le polychélate se fixerait plutôt à l'ADN par de courts segments entraînant vraisemblablement une déformation locale réciproque de la double hélice, ce qui expliquerait la déstabilisation de l'ADN observée ; la majeure partie du polychélate serait donc extérieure à la double hélice.

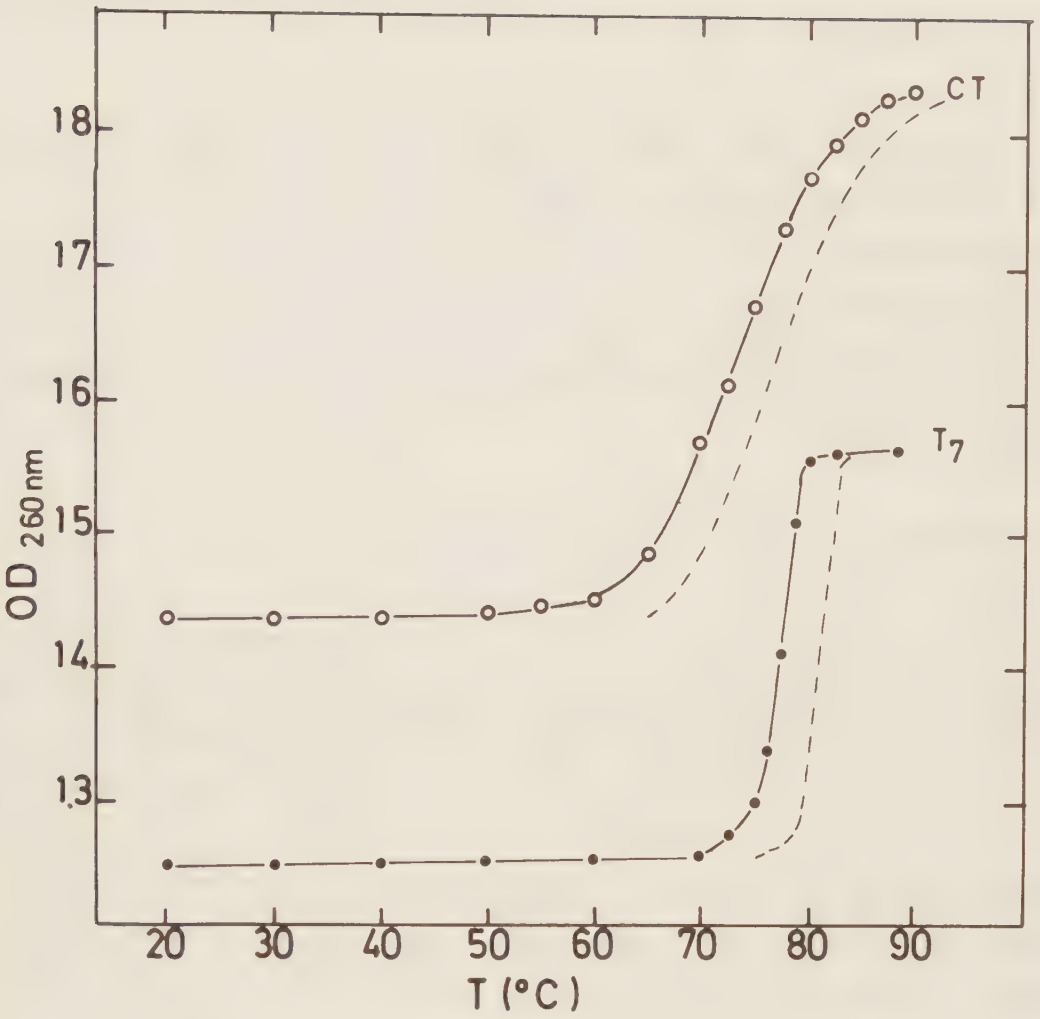


FIGURE 61 - T_M DU COMPLEXE II ($Rg\text{-}Mg\text{-}AN_2$) en solution dans le tampon cacodylate de sodium (0,01 M ; pH 7,2) :

-o- ADN de thymus de veau (CT) (0,22 mM)
+ rugulosine (0,027 mM)
+ $MgCl_2$ (0,1 mM)

-•- ADN de phage T_7 (0,19 mM)
+ rugulosine (0,027 mM)
+ $MgCl_2$ (0,1 mM)

.... : témoin (sans pigment)

La DO_{260} est enregistrée à chaque palier de température laquelle est mesurée à l'aide d'un thermocouple plongeant dans la solution.

5) Stabilité du complexe II

On peut envisager que la stabilité du complexe II formé selon le modèle proposé ci-dessus provienne de la nature covalente des liaisons entre le polychélate et l'ADN. Par contre, s'il s'agit de liaisons électrostatiques on doit s'attendre à ce que le polychélate de mieux en mieux formé en fonction du temps se détache peu à peu de la double hélice et précipite en milieu aqueux selon le schéma :

$$\text{complexe II} \underset{2}{\rightleftharpoons} \text{ADN}_{II} + \text{Polychélate} \downarrow$$

Nos essais montrent en effet que toutes les solutions de complexe II (même les plus stables) précipitent après un temps suffisamment long (quelques jours à un mois selon la valeur du rapport Mg/D). Pour les rapports Mg/D élevés (20 à 40) la précipitation est très lente alors que pour les faibles rapports (1,5 à 4) celle-ci est relativement rapide ($\sim$ 2 jours). Le précipité jaune est constitué de polychélate (décelé en DC) associé à de l'ADN et le surnageant ne contient pratiquement que de l'ADN libre. Dans tous les cas, l'équilibre est déplacé vers la droite.

Réciproquement, est-il possible d'obtenir le complexe II à partir de ses constituants (sens 2 de la réaction) ? Nous avons mélangé un excès ADN_2 (0,3 mM) à une suspension de polychélate (Ls = 0,03 mM, Mg/Ls = 20, force ionique 0,01 M). L'association se fait très mal, le polychélate est de nouveau totalement précipité après 24 heures (notons que la même expérience avec le poly(I) ou le poly(A) permet de solubiliser en partie le polychélate, la précipitation totale ne réapparaissant qu'après plusieurs jours). Le sens (2) de réaction est donc pratiquement interdit malgré la grande stabilité du complexe II. La formation du précipité de polychélate est au contraire en faveur du sens Gauche-Droite.

En conclusion, la dissociation finale du complexe II semble exclure la fixation par liaison covalente.

6) Influence de la force ionique

Cette étude a pour but de vérifier le rôle des liaisons électrostatiques impliquées dans la stabilisation du complexe II.

L'augmentation de la force ionique ralentit la formation du polychélate et du complexe II. Le tableau ci-dessous permet de comparer les pourcentages de polychélate et du complexe II ($C_{Ls} = C_{Rg} = 2{,}5.10^{-5}$M P/D = 4 Mg/D = 1,5) formés à 0,01 , 0,1 et 1 M en concentration saline (NaCl) ; les mesures sont faites (1 h 30 mn après addition du Mg^{++}) à 495 nm et 465 nm respectivement pour la lutéoskyrine et la rugulosine.

TABLEAU 6 - Effet de la force ionique sur la formation du complexe II

NaCl	AN_2 -Ls-Mg		Ls - Mg		An_2 -Rg-Mg		Rg - Mg	
	$10^5.\Delta\varepsilon_{495nm}$	%	$10^5.\Delta\varepsilon_{495nm}$	%	$10^5.\Delta\varepsilon_{465nm}$	%	$10^5.\Delta\varepsilon_{465nm}$	%
0,01M	313	100	313	100	- 56	100	- 149	100
0,1 M	223	71	163	52	- 29	52	- 110	73
1 M	91	29	67	21	- 3	5	- 35	23

Les résultats antérieurs sur la nature du polychélate permettent de comprendre que l'accroissement de la force ionique ralentit la chélation de l'ion divalent. De ce fait la stabilisation des molécules successives de pigment se trouve réduite. Un phénomène analogue se produit dans le cas du complexe II.

Dans le cas des complexes de Ls à force ionique 0,01 M , condition la plus favorable pour la formation rapide du polychélate (le $\Delta\varepsilon_{max}$ ne dépassant pas 400 mm - après 17 heures à 37°C), la présence d'ADN ne modifie pas la valeur de $\Delta\varepsilon$ par rapport au contrôle $(Ls\ Mg)_n$ mais à force ionique plus élevée le complexe II se forme mieux que le polychélate.

Pour les complexes de Rg à toutes forces ioniques, le complexe II se forme au contraire moins bien que le polychélate.

Le polychélate $(Ls\ Mg)_n$ et l'ADN_2 étant tous deux des polymères en hélice droite, on comprend qu'il y ait accélération du processus de polychélation en présence d'ADN. Les sens contraires des hélices $(Rg\ Mg)_n$ et ADN_2 défavoriseraient au contraire la formation du polychélate sur l'ADN. On peut donc conclure à un "effet d'orientation" du biopolymère.

7) Etude en ultracentrifugation analytique

L'étude des relations spatiales entre polychélates et acides nucléiques a été faite par ultracentrifugation analytique des solutions de complexes II formés entre Ls ou Rg et divers polynucléotides double brins (dont l'ADN_2). Les résultats sont résumés dans le tableau 7 . Le rapport des masses M/Mo $\left(\frac{\text{complexe}}{\text{acide nucléique de référence}}\right)$ a été calculé d'après les formules approchées relatives aux polynucléotides en pelote statistique (STEINER et BEERS 1961, DOTY et al 1958) où l'on a :

$$S_{20,W} = K\ M^{\alpha} \quad \text{avec} \quad 0{,}33 < \alpha < 0{,}5$$

$S_{20,W}$ = coefficient de sédimentation à 20°C dans l'eau (l'influence du tampon phosphate 0,01 M est négligeable), exprimé en Svedberg.

K = constante dépendant notamment du volume partiel spécifique et du coefficient de diffusion du polymère considéré

M = masse molaire du polymère

α = coefficient dépendant de la forme (bâtonnet ou pelote) du polymère.

L'augmentation du $S_{20,W}$ des solutions de complexe II par rapport à celui des polymères de référence est compatible avec l'existence de liaisons unissant les doubles hélices par l'intermédiaire du polychélate. Le nombre de doubles hélices d'ADN ainsi reliées varie selon la durée d'incubation du mélange (pigment + ADN + $MgCl_2$) :

Polymères	D/P	Mesures après 2 h à 37°C			Mesures après 20 j supplémentaires à 4°C .		
		$S_{20,W}$		M/M_o	$S_{20,W}$		M/M_o
		UV	Vis		UV	Vis	
ADN	0	15,2		1	13,0		1
ADN-Mg-Ls	0,17	32,2		4,5 à 9,5	53,4 14	53,4	17 à 70 ~1
ADN-Mg-Rg	0,14	*			62,4 14	62,4	23 à 110 ~1
Poly(A).Poly(U)	0				7,7		1
(A).(U)-Mg-Ls	0,21	14,3	14,3		*		
(A).(U)-Mg-Rg	0,18				12,7		2,7 à 4,4
Poly(I).Poly(C)	0	*			*		
(I).(C)-Mg-Ls	0,12				8,8	8,7	
(I).(C)-Mg-Rg	0,10				10,9	10,9	

TABLEAU 7 - Résultats d'ultracentrifugation analytique [BECKMAN Spinco Model E équipée d'un système à balayage (PERNOLLET, 1974)].

D/P = rapport pigment/polymère

M/M_o = rapport des masses molaires du complexe et de l'acide nucléique, les valeurs indiquées correspondent aux valeurs limites du coefficient α (voir texte).

* = solution polydisperse .

Les acides nucléiques ont été dialysés trois fois contre la solution (EDTA 0,01 M ; NaCl 0,1 M ; tampon phosphate 0,01 M ; pH 7), puis plusieurs fois contre le tampon d'utilisation (tampon phosphate 0,01 M ; pH 7,4). La concentration en pigment était voisine de 0,025 mM .

a) Après incubation des solutions pendant 2 heures à 37°C, le profil de sédimentation ne présente qu'une seule vague ; il n'y a pas d'ADN libre. La valeur relativement faible du rapport $\frac{M}{M_o}$ calculé en négligeant la masse molaire des segments de polychélate du complexe II suggère que le nombre de molécules d'ADN par molécule de complexe est au moins égal à 4 .

b) Après un séjour supplémentaire des solutions à 4°C pendant 20 jours, le profil de sédimentation comporte une seule vague à 435 nm (Ls ou Rg complexé à l'ADN) mais deux vagues à 268 nm (ADN libre et ADN complexé au pigment).

La première vague ($S_{20,W}$ = 53,4 et 62,4 respectivement pour Ls et Rg) observable à la fois dans le visible et dans l'UV correspond à la sédimentation des molécules de complexe II, le polychélate libre présent éventuellement ayant sédimenté au cours de la montée en vitesse de la centrifugeuse. Le nombre de molécules d'ADN par molécule de complexe II serait d'après le calcul au minimum de 20. L'augmentation de la masse moléculaire du complexe II est dûe à l'allongement du polychélate fixé sur l'ADN, lequel se fait au détriment des petits segments chélatés moins stables qui se détachent pour cette raison du biopolymère (Fig. 62)

Cette interprétation permet d'expliquer la libération au cours du temps de molécules d'ADN libres comme le montre notamment l'existence d'une deuxième vague de sédimentation.

Il faut noter qu'en fonction du temps la distribution réciproque des molécules d'ADN et de polychélate se modifie. D'une situation initiale où toutes les molécules d'ADN sont liées à au moins une molécule de polychélate on évolue vers une situation impliquant la réticulation de nombreuses molécules d'ADN par des polychélates et l'apparition de molécules d'ADN libres d'interaction avec le pigment. Il est vraisemblable que dans ce processus la taille des polychélates tend à augmenter puisqu'il y a , avec le temps,rupture des liaisons avec les molécules d'ADN et précipitation du polychélate.

FIGURE 62 - AUGMENTATION DU $S_{20,W}$ au cours du temps de solutions ADN_2 + pigment + Mg^{++} .

Chaque trait vertical représente une molécule d'ADN
Les segments de droite horizontaux représentent des bouts de polychélates $(pigment\text{-}ion)_n$.

1) t = 2 h à 37°C
- Absence d'ADN libre (S_{20,W_1} faible)

2) t'= t + 15 jours à 4°C
- Présence d'ADN libre en solution
(S_{20,W_2} S_{20,W_1})

Dans les cas des polynucléotides synthétiques, la polydispersité du contrôle sans pigment peut provenir d'une part de l'hydrolyse partielle du produit commercial utilisé, d'autre part de l'activation de la RNase en présence de Mg^{++} (BUTZOW et EICHORN, 1965).Quoi qu'il en soit, les solutions de complexes II sont monodisperses . Le nombre de molécules de biopolymères par molécule de complexe II est faible par rapport au cas de l'ADN, mais la monodispersité révèle à notre avis une distribution homogène de poids moléculaire conforme à l'hypothèse d'une structure de complexe II en réseau.

8) Modèle du complexe II

Nous avons déjà envisagé le mode de croissance du polychélate en présence d'ADN ou de différents polynucléotides double brins. Le schéma (a ou b) ci-dessous permet d'en résumer les étapes successives (Fig. 63).

Les ions divalents liés soit au polyphosphate soit au pigment assurent au moment du mélange des réactifs la fixation statistique des molécules monomères de lutéoskyrine ou de rugulosine aux groupes phosphates de l'acide nucléique, la fixation se faisant probablement sur le pigment au niveau de la cage.

Les monomères se décrochent ensuite pour s'associer sous forme de petits segments de polychélate plus stables, le magnésium étant alors fixé d'une part à l'ADN et d'autre part aux CO_5^- et/ou $C = O_{10}$ du pigment.

Le polychélate fixé par une de ses extrémités à l'ADN s'allonge et relie une ou plusieurs autres molécules de biopolymères. Etant donné que le polychélate n'est tenu que par des segments assez courts sur l'ADN, la stabilité n'est plus suffisante au-delà d'une certaine taille et peu à peu tout le polychélate précipite libérant le biopolymère.

Nous discuterons ici plus particulièrement du mode d'ancrage du polychélate aux acides nucléiques double brins.

Nous avons vu (étude de l'effet de la force ionique) que l'hélice droite d'ADN favorisait davantage la formation du polychélate de lutéoskyrine (hélice droite également) que celle de la rugulosine (hélice gauche). Compte tenu de cet effet d'orientation dû au biopolymère nous proposons deux modèles de fixation l'un valable pour la lutéoskyrine seulement, l'autre valable à la fois pour Rg et Ls. L'examen détaillé de ces deux types de structures a été fait à l'aide de modèles CPK d'ADN natif et de polychélate $[(Ls \text{ ou } Rg)Mg^{++}]_n$.

Selon le premier mode de fixation (schéma a) il est possible d'insérer, sans déformation des modèles, le polychélate de lutéoskyrine dans le grand sillon de l'ADN à condition toutefois que la fixation se fasse bout à bout et n'excède pas environ 3/4 de tour du polychélate (ce qui correspond à 4 ou 5 paires de bases). La stabilité pourrait être dûe simplement à l'existence de liaisons hydrophobes ou bien à des liaisons électrostatiques du Mg^{++} avec le N_7 ou le $CO(ou\ NH_2)$ en 6 des purines par exemple, ou encore à la coïncidence des axes binaires du pigment et de l'ADN (cas de l'actinomycine, SOBELL 1972).

Une insertion sur une longueur plus importante (et a fortiori sur toute la longueur) du polychélate - non déformé - dans le grand sillon de l'ADN est impossible en raison notamment des pas respectifs différents (27 Å et 34 Å) des deux hélices considérées.

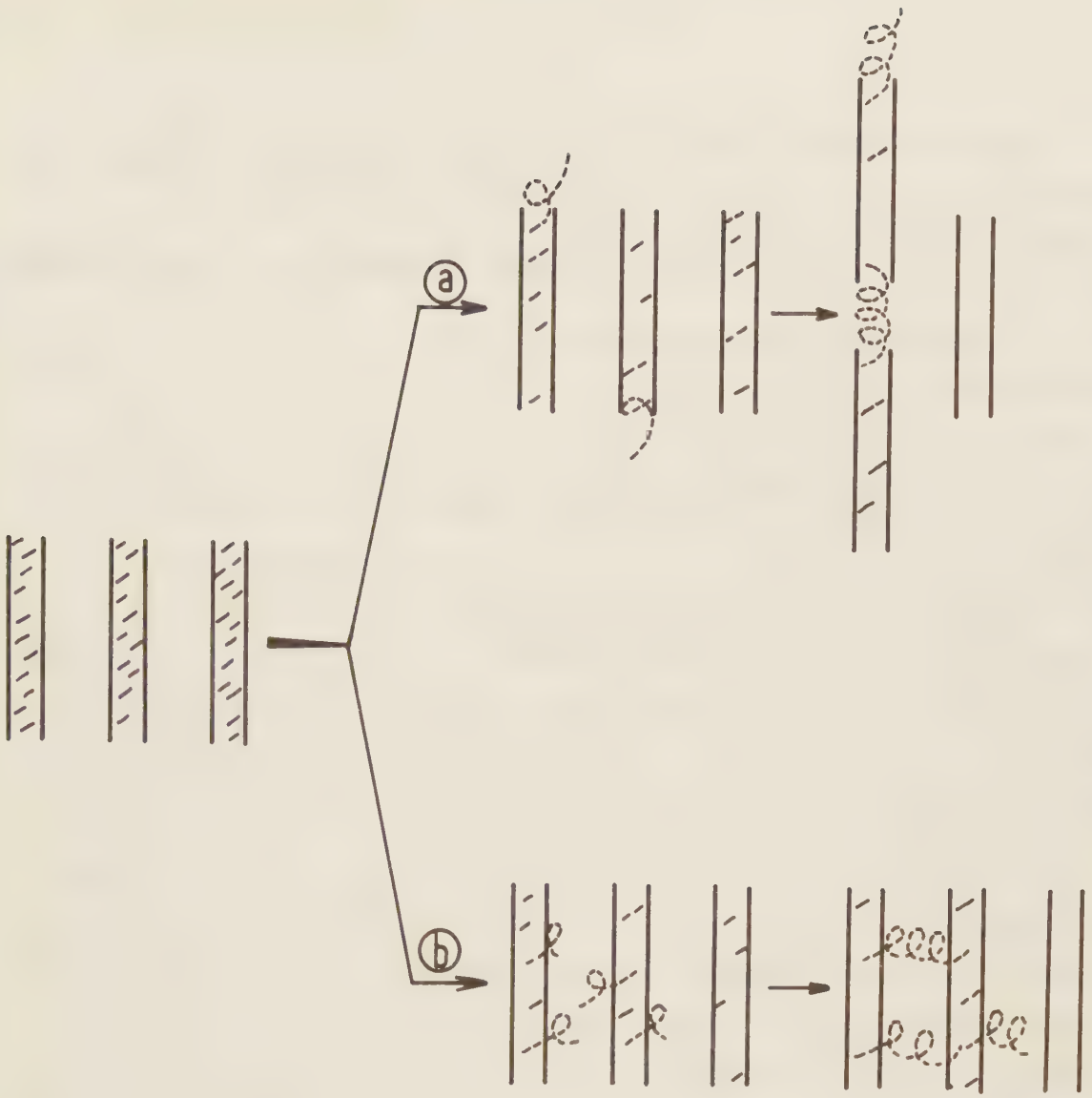


FIGURE 63 - MODELE DU COMPLEXE II

a) Mode de fixation longitudinale
[Fixation du polychélate Ls-(Mg-Ls)$_n$-Mg dans le grand sillon des extrêmités de la chaîne d'ADN]

b) Mode de fixation transversale
[Fixation latérale du polychélate de Ls ou Rg aux groupes phosphates de l'ADN]

On distingue, dans les deux modes a et b, trois étapes successives :

1) Fixation statistique d'unités monomériques (pigment+ion divalent) (représentés par des traits obliques), sur l'ADN$_2$ (représenté par deux traits verticaux)

2) Formation des segments courts de polychélate

3) Réticulation et libération des molécules d'ADN

Le polychélate fixé en bout de chaine d'ADN présente en solution une extrémité libre susceptible de s'allonger par chélations successives de molécules de pigment et d'accrocher d'autres molécules d'ADN selon un mode d'enchaînement longitudinal.

Le deuxième type de liaison (schéma b) impliquerait une fixation externe à la double hélice par l'intermédiaire des ions métalliques reliant le polychélate à la chaîne polyphosphate: Etant donné la faible distance (3-4 Å) des ions Mg^{++} à l'axe de l'hélice du polychélate, il n'est pas possible d'envisager une association en superhélice autour de l'ADN au niveau des groupements phosphates (distance des phosphates à l'axe $\simeq$ 9 Å). Une superhélice peut par contre être obtenue - par déformation locale soit de l'hélice d'ADN (en accord avec la faible destabilisation thermique de l'ADN observée) soit de l'hélice de polychélate, soit encore des deux à la fois. Une telle déformation du polychélate néoformé sur l'ADN par rapport au modèle classique de polychélate peut être dûe à un mode d'enchaînement différent des unités monomères Rg-Mg ou Ls-Mg. L'ion magnésium unissant par exemple deux molécules voisines de pigment à raison de une et non de deux liaisons par monomère, il en résulte une flexibilité plus grande de la chaîne de polychélate, l'angle compris entre 2 axes y'_1 et y_2 de 2 monomères voisins variant de 120 à 170°. Il s'ensuit un allongement du rayon de l'hélice de polychélate (de 4 à 10 Å) compatible avec un enroulement en superhélice autour de la chaîne polyphosphate.

Pour des raisons de stabilité un tel arrangement superhélicoïdal ne peut concerner qu'un segment assez court (probablement 2 à 3 ions Mg^{++}) du polychélate néoformé sur l'ADN. La croissance normale du polychélate se poursuit alors hors de la double hélice selon le processus classique (le modèle proposé est, notons-le, comparable au modèle III de STRYER et BLOUT - 1961 - relatif à l'association acide polyglutamique - acridines).

En conclusion, le complexe II est formé d'un réseau de molécules d'ADN reliées entre elles par des molécules de polychélates de pigment soit transversalement dans le cas de la Rg (schéma b), soit transversalement et longitudinalement dans le cas de la Ls (schéma a et b).

3ème PARTIE - CHAPITRE III

COMPLEXE I : (Pigment - ion divalent - AN_1)

-:-:-:-:-

1) Rappel des résultats antérieurs sur le complexe I

La lutéoskyrine s'associe, en présence de $MgCl_2$, à l'ADN de thymus de veau dénaturé par la chaleur (OHBA et FROMAGEOT, 1967). Le complexe formé (désigné par complexe I) est caractérisé par un déplacement hypsochrome (10 nm) du maximum de la bande d'absorption vers 450 nm. La formation du complexe I nécessite la présence des bases puriques. Le complexe I se forme aussi bien avec l'ADN apyrimidique qu'avec l'ADN dénaturé (par chauffage) de Cytophaga johnsonii, de thymus, de E.coli, de M. lysodeikticus. La stoéchiométrie du complexe I avec les ADN mono caténaires est Pu/Ls/Mg $\simeq$ 2/1/1 .(OHBA et FROMAGEOT, 1968). Ce complexe spécifique des acides ribo ou désoxyribonucléiques puriniques empêche la dénaturation thermique de l'ADN monocaténaire. Il serait probablement responsable de l'inhibition de la transcription des RNA et DNA polymérases in vitro (SENTENAC et al 1967, RUET et al 1973) ainsi que de la réparation de l'ADN (MOUTON et FROMAGEOT, 1971).

L'objet de ce chapitre est de préciser les modalités d'interaction entre la lutéoskyrine (ou la rugulosine) et les acides nucléiques monocaténaires (plus particulièrement les ribopolymères).

2) Spectres d'absorption et de DC des complexes (pigment - AN_1)

On peut caractériser rapidement les complexes par leurs spectres d'absorption et de DC, ces derniers étant les plus caractéristiques.

a - Complexes de la lutéoskyrine

Les spectres d'absorption (Fig. 64) et de DC (Fig. 65) des mélanges de lutéoskyrine et d'acides nucléiques monocaténaires en présence d'ions divalents indiquent l'existence de 2 types de complexes.

- Le complexe I formé entre Ls et le poly(A) ou le poly(I), polymères puriniques, est caractérisé en absorption comparativement au pigment libre par un effet hyper et hypsochrome (10-15nm) du maximum de la bande vers 450 nm d'une part et par l'existence d'un épaulement situé vers 460 nm d'autre part. En DC, la bande dichroique correspondante est fortement négative. L'allure des spectres DC rappelle celle du pigment libre en milieu organique (comparer avec la Fig.5 b) mais l'intensité des bandes dichroiques du complexe est comparativement environ 2 fois plus importante.

- Le complexe II formé entre Ls et les polynucléotides pyrimidiques poly(C) , poly(U), présente des spectres d'absorption et de DC similaires à ceux du complexe II avec l'ADN bicaténaire (Fig. 57 et 58). Les complexes II formés avec les acides nucléiques monobrins (AN_1) sont cependant moins stables que ceux formés avec les doubles brins (AN_2). Le spectre (_ ... _) de la Fig. 66 montre que dans les conditions utilisées (0,01 NaCl, 1 mM Mg_2), le polychélate Ls Mg se décroche en partie du poly(C) et précipite. A force ionique supérieure (0,1 M NaCl ; 0,5 mM $MgCl_2$) le polychélate se détache complètement du poly(C) ou du poly(U) au bout de quelques jours à 20°C.

En présence d'ADN de thymus de veau dénaturé, par chauffage à 100°C pendant 30 mn puis trempe dans la glace, la Ls présente un spectre d'absorption caractéristique de complexe I (Fig. 64 , et OHBA et FROMAGEOT 1967 et 1968). Le spectre DC révèle cependant la présence de complexe II en faible quantité ($\sim$ 1/15).

Le poly(G), même chauffé, possède une structure secondaire (Chapitre I, 3ème partie). L'allure du spectre d'absorption ainsi que l'allure et l'intensité du spectre de DC du complexe poly(G)/Ls montrent que la solution contient en fait beaucoup de complexe II et peu de complexe I.

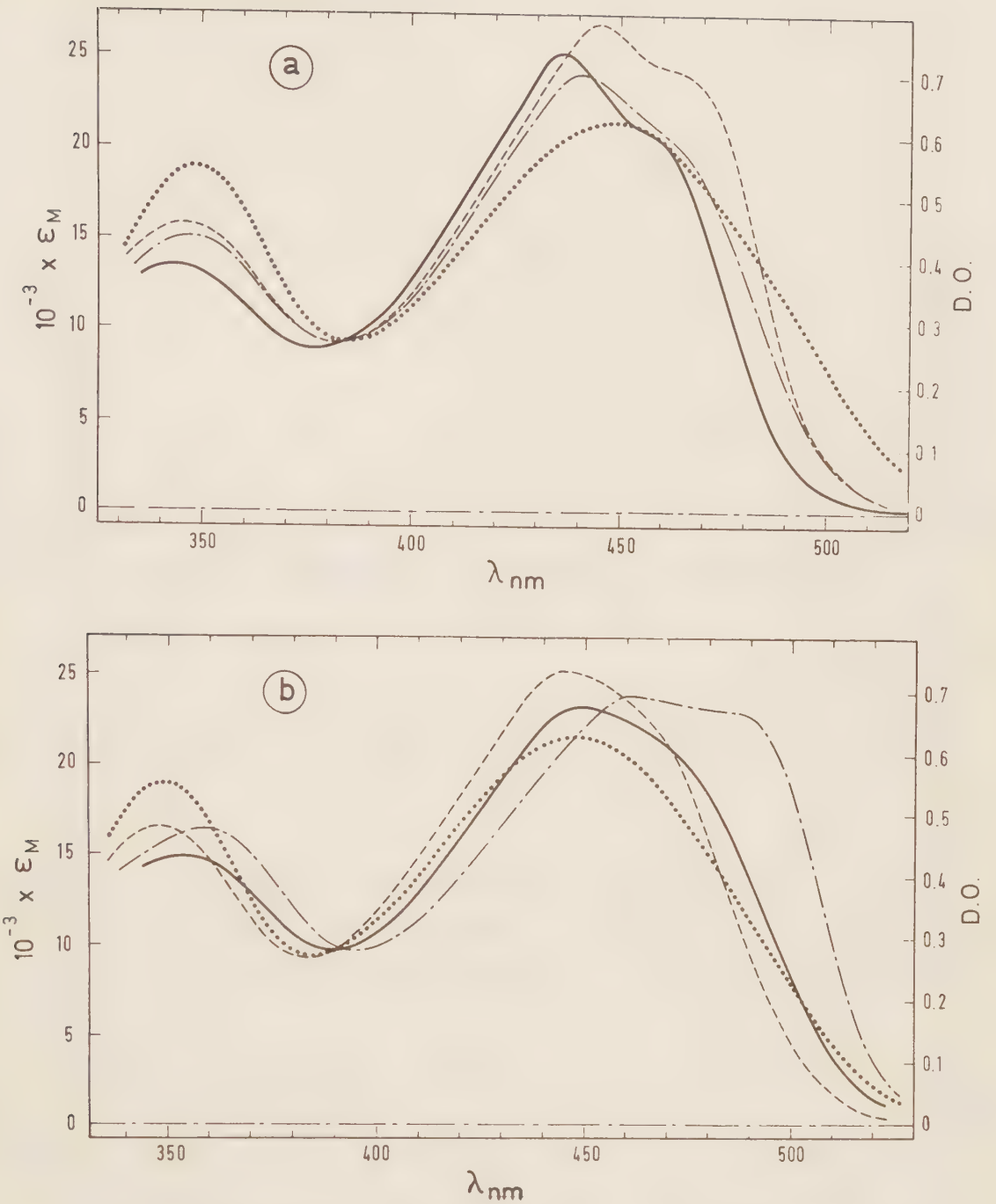


FIGURE 64 - SPECTRES D'ABSORPTION (30 mn après mélange des réactifs) des solutions dans le tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,4) de :

..... : lutéoskyrine témoin (0,0295 mM)
a) ——— : Ls (0,0295 mM) + poly(I) (0,150 mM)+$MgCl_2$(1mM)
- - - : " + poly(A) (0,130 mM)+$MgCl_2$(1mM)
-·- : " + ADN_1 (0,110 mM) + "
b) ——— : " + poly(G) (0,166 mM)+ "
- - - : " + poly(U) (0,145 mM)+ "
-·- : " + poly(C) (0,227 mM)+ "

L'ADN est obtenu en chauffant de l'ADN natif de thymus de veau pendant 30 mn à 100°C, puis en trempant la solution dans la glace pilée. Les polynucléotides (P.L. Biochemicals Inc.) sont dialysés comme précédemment (voir Fig. 58).

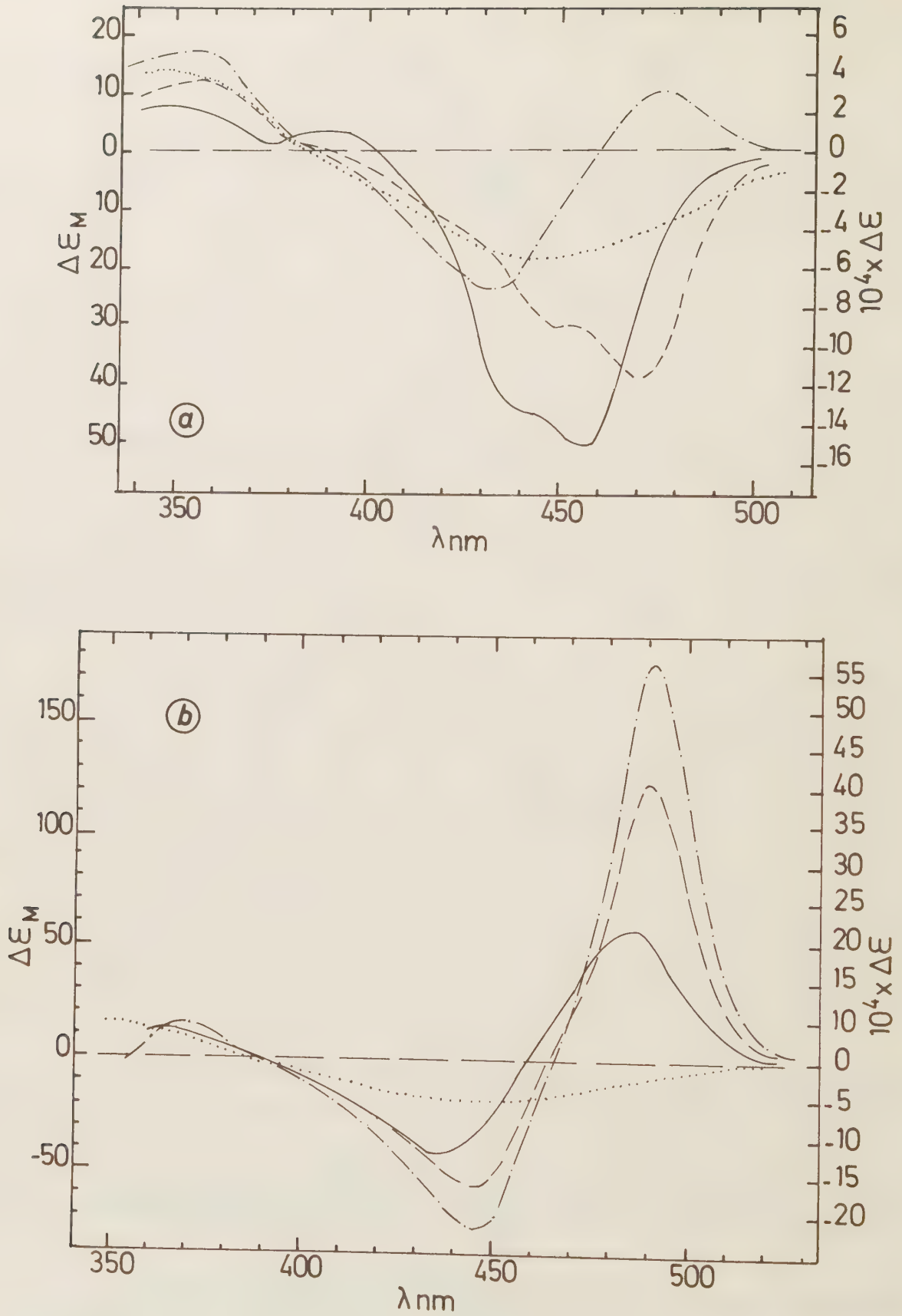


FIGURE 65 - SPECTRES DE DICHROISME CIRCULAIRE DES SOLUTIONS DE $[Ls + AN_1 + MgCl_2]$
(voir légendes Fig. 64).

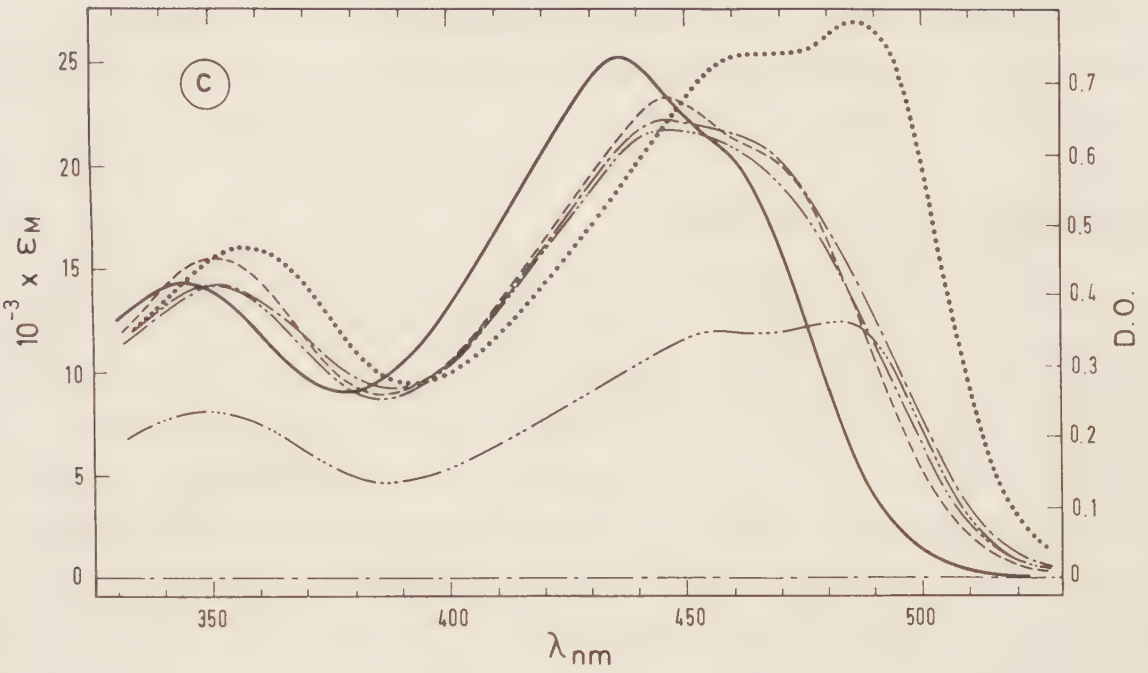


FIGURE 66 - SPECTRES D'ABSORPTION DES SOLUTIONS DE (Ls + An_1 + $MgCl_2$)

Les spectres sont enregistrés après incubation à 23°C pendant 15 jours et après centrifugation (1 000 g, 1 heure) des solutions :

——— Ls + Poly(I) + $MgCl_2$
- - - Ls + Poly(A) + $MgCl_2$
-•-•- Ls + Poly(G) + $MgCl_2$
-••- Ls + ADN_1 + $MgCl_2$
-•••- Ls + Poly(C) + $MgCl_2$
····· Ls + Poly(U) + $MgCl_2$

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles de la figure 64.

Signalons que dans les meilleures conditions de formation du complexe I [1 mM en $MgCl_2$, poly(I) ou poly(A)/D > 4] les spectres de la forme I évoluent lentement au cours du temps vers ceux de la forme II : après conservation des solutions pendant 4 jours à 4°C suivie d'une incubation à 37°C pendant 2 heures, l'intensité dichroique des complexes I entre Ls et le poly(I) et le poly(A) diminue de 16 % et 34 % respectivement.

b - Complexes de la rugulosine

Les spectres d'absorption (Fig. 67) et de DC (Fig. 68) montrent que la rugulosine, comme la Ls , forme deux types de complexes. Le complexe du type I se forme en présence de poly(I), de poly(A) ou d'ADN dénaturé. Ce complexe est caractérisé en absorption par un déplacement hypsochrome par rapport au pigment libre de la bande du visible, et en DC par une augmentation de l'intensité dichroique de la bande correspondante (430 nm), sauf dans le cas de l'ADN où le spectre DC est perturbé par la présence probable de complexe II en faible quantité. Le complexe du type II s'observe en présence de $MgCl_2$ pour les mélanges Rg + poly(G) ou poly(C), et de façon moins évidente avec le poly(U).

En fonction du temps (2 semaines à 20°C) seul le complexe I avec le poly(A) reste stable, les autres se transforment plus ou moins en complexe II.

En conclusion, seuls les polynucléotides comportant des bases puriques forment des complexes caractéristiques du type I avec la lutéoskyrine et la rugulosine, les complexes les plus stables étant poly(I)-Mg-Ls et poly(A)-Mg-Rg.

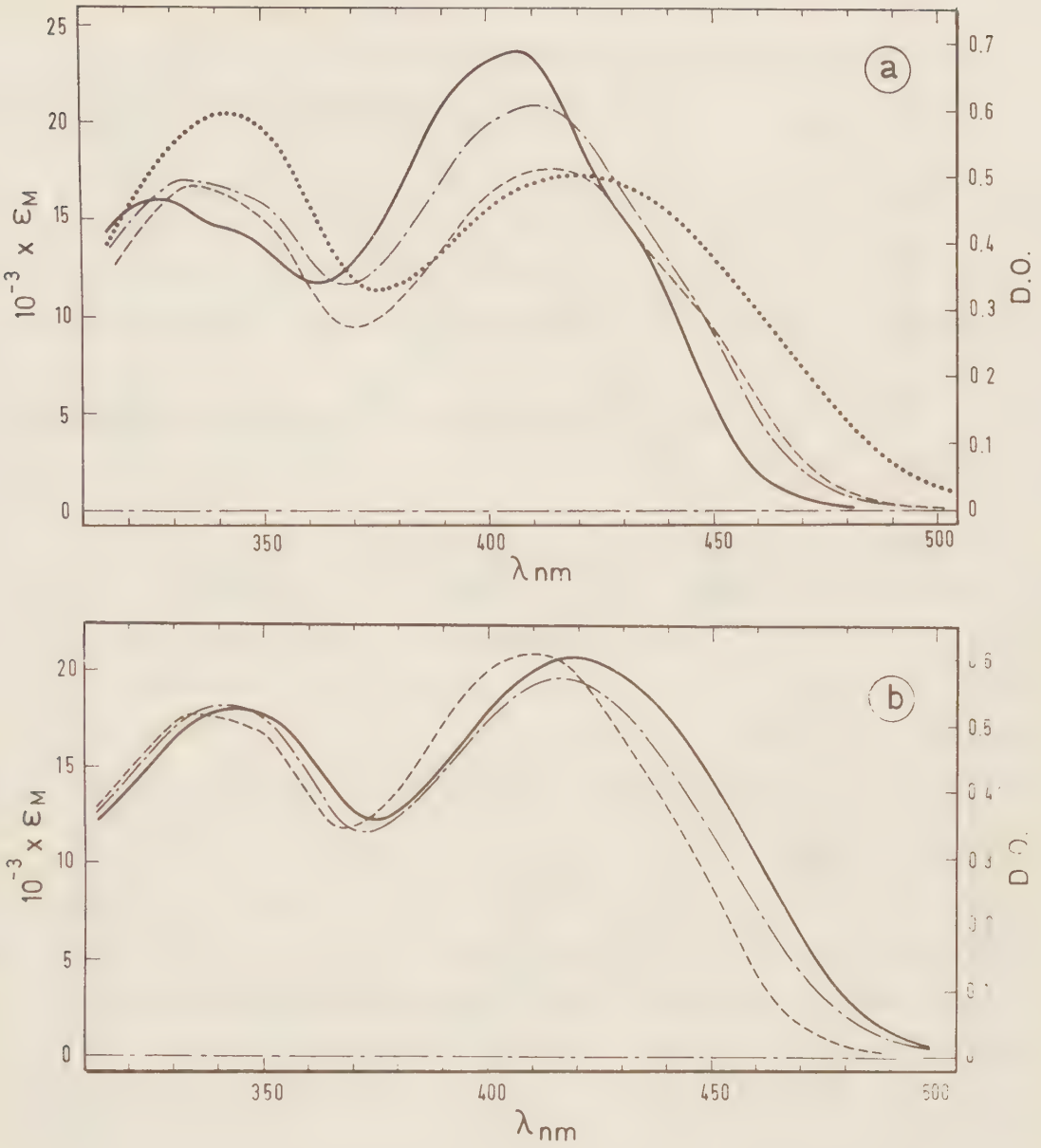


FIGURE 67 - SPECTRES D'ABSORPTION DES SOLUTIONS DE (Rg + AN_1 + $MgCl_2$).

Les spectres des solutions dans le tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,4) sont enregistrés 30 mn après mélange des réactifs de :

a) ..... : rugulosine (0,0295 mM)
——— : rugulosine + Poly(I) + $MgCl_2$
- - - : rugulosine + Poly(A) + $MgCl_2$
-·-·- : rugulosine + ADN_1 + $MgCl_2$

b) ——— : rugulosine + Poly(G) + $MgCl_2$
- - - : rugulosine + Poly(U) + $MgCl_2$
-·-·- : rugulosine + Poly(C) + $MgCl_2$

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles des figures 58 et 64.

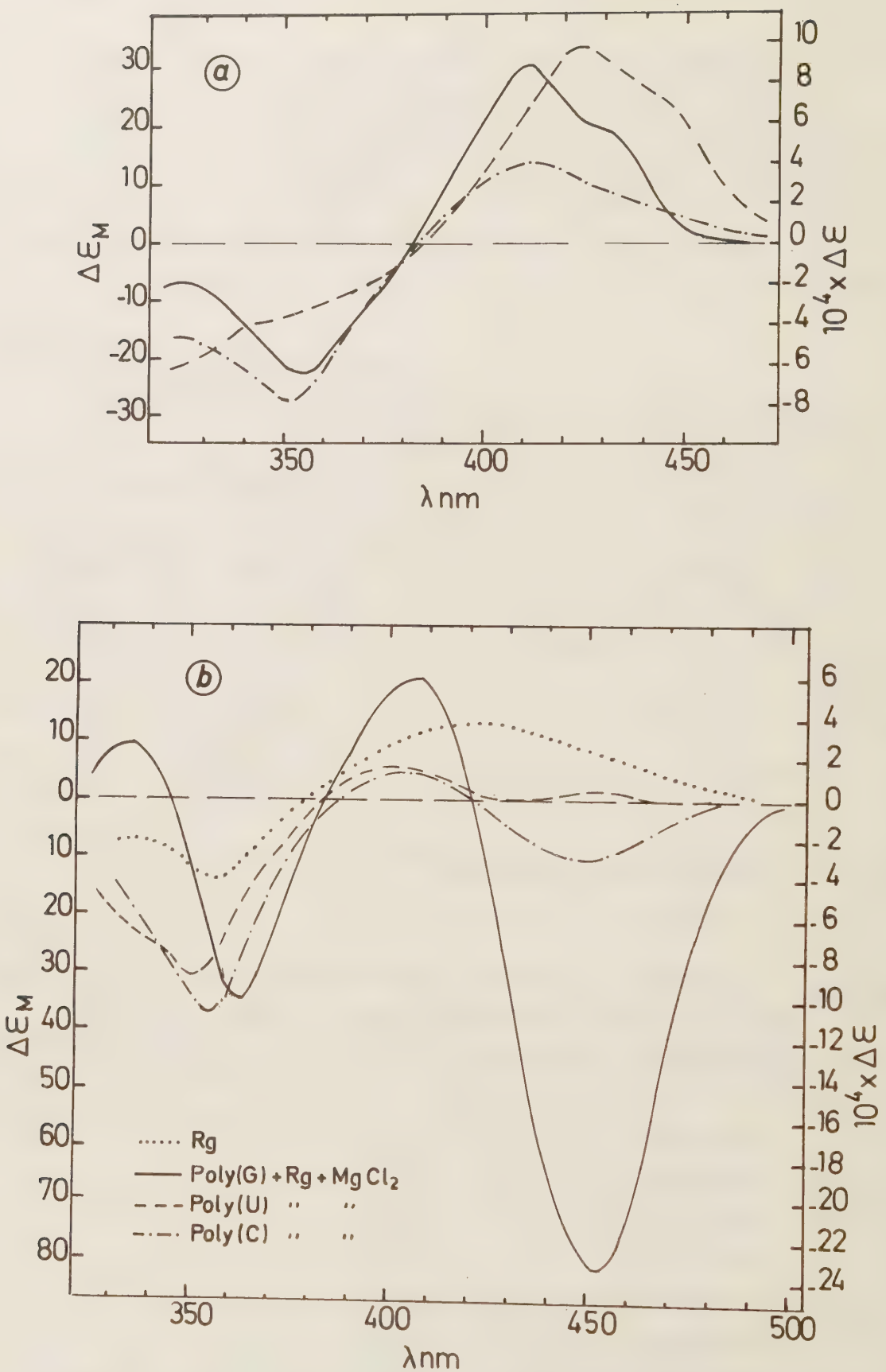


FIGURE 68 - SPECTRES DE DICHROISME CIRCULAIRE DES SOLUTIONS DE ($Rg + AN_1 + MgCl_2$)
(mêmes légendes que la figure 67)

3) Titrage des constituants du complexe I

Nous allons déterminer successivement la quantité d'ions Mg^{2+} engagés dans le complexe I, ainsi que le rapport Acide nucléique/Pigment (encore désigné par rapport P/D ou Phosphate/Dye), optimum correspondant à la formation du complexe I.

a - Stoéchiométrie du Mg^{++} dans le complexe I

Cas de la lutéoskyrine

La quantité d'ions Mg^{2+} engagés dans le complexe I (AN_1-Mg-Ls) mesurée par différence après dialyse est équimolaire à celle du pigment (OHBA et FROMAGEOT, 1968). Nous avons titré par spectrophotométrie d'absorption et de DC la quantité d'ions Mg^{++} du complexe I le plus stable dans les conditions utilisées : poly(I)-Mg-Ls pH 7,4, 0,01 M, NaCl . Les spectres d'absorption à 3 rapports différents de Mg/Ls (Fig. 69) présentent une série seulement de points isobestes semblant indiquer qu'il n'existe en solution que deux formes en équilibre (forme libre et forme liée). Les spectres correspondants de DC - méthode plus sensible - présentent cependant non pas une mais deux séries de points isobestes I et J selon que le rapport Mg/Ls est inférieur ou supérieur à 0,5. Ce résultat suggère que le phénomène n'est pas aussi simple que le révèle l'examen des spectres d'absorption : la variation de l'intensité des bandes caractéristiques d'absorption et de DC à différentes longueurs d'ondes (Fig. 70) en fonction de r = Mg/D montre qu'il existe dans les conditions utilisées un complexe de stoéchiométrie (1:1) mélangé pour $R \leq 0,5$ à la forme libre du pigment et à celle du complexe M (complexe initial de polychélation, voir 2ème partie) en faible proportion. Les complexes I et M présenteraient une répartition électronique semblable (mêmes spectres d'absorption) mais des compositions différentes (spectre de DC différents). Pour éliminer la présence du complexe M, il faudrait augmenter la force ionique jusqu'à 1 M, ce qui est irréalisable en raison de l'agrégation du poly(I) à haute force ionique.

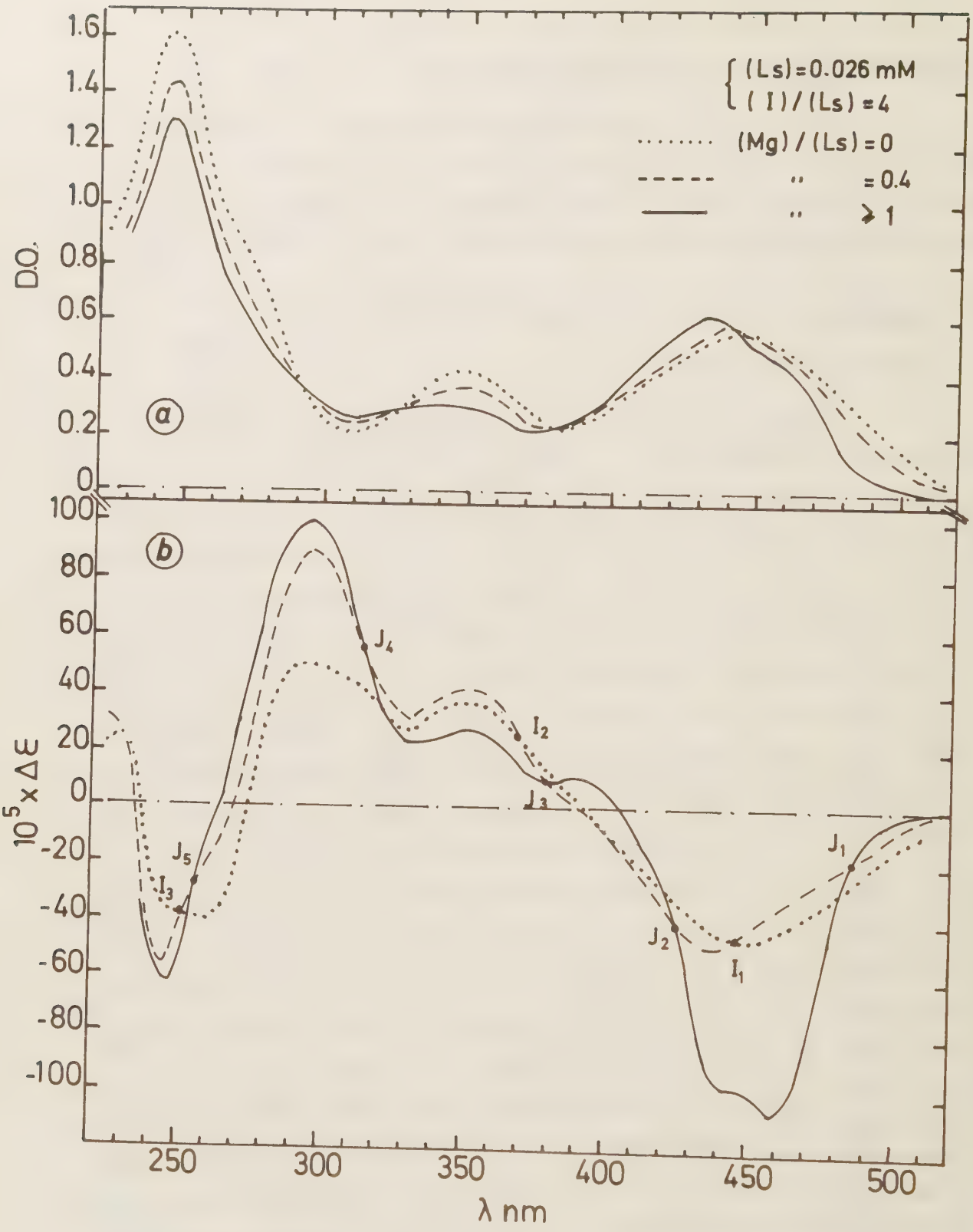
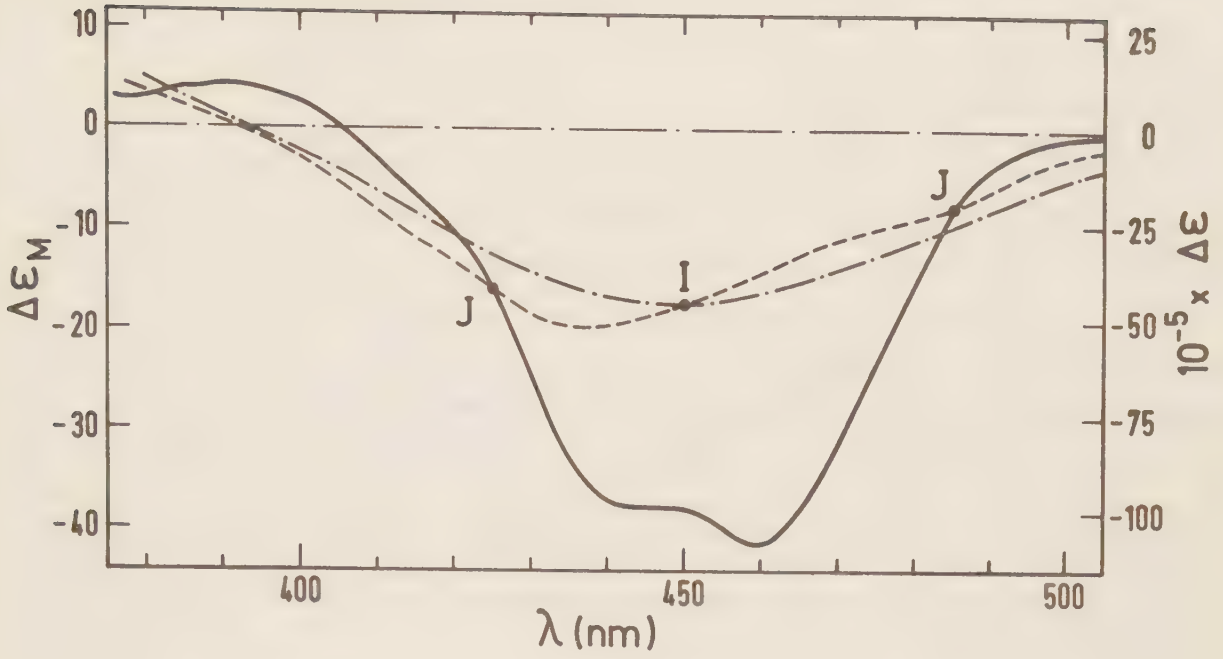


FIGURE 69 - SPECTRES D'ABSORPTION (a) ET DE DC (b) des solutions de [Ls + poly(I)] et [Ls + poly(I) + $MgCl_2$] à différentes concentrations dans le tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,4).



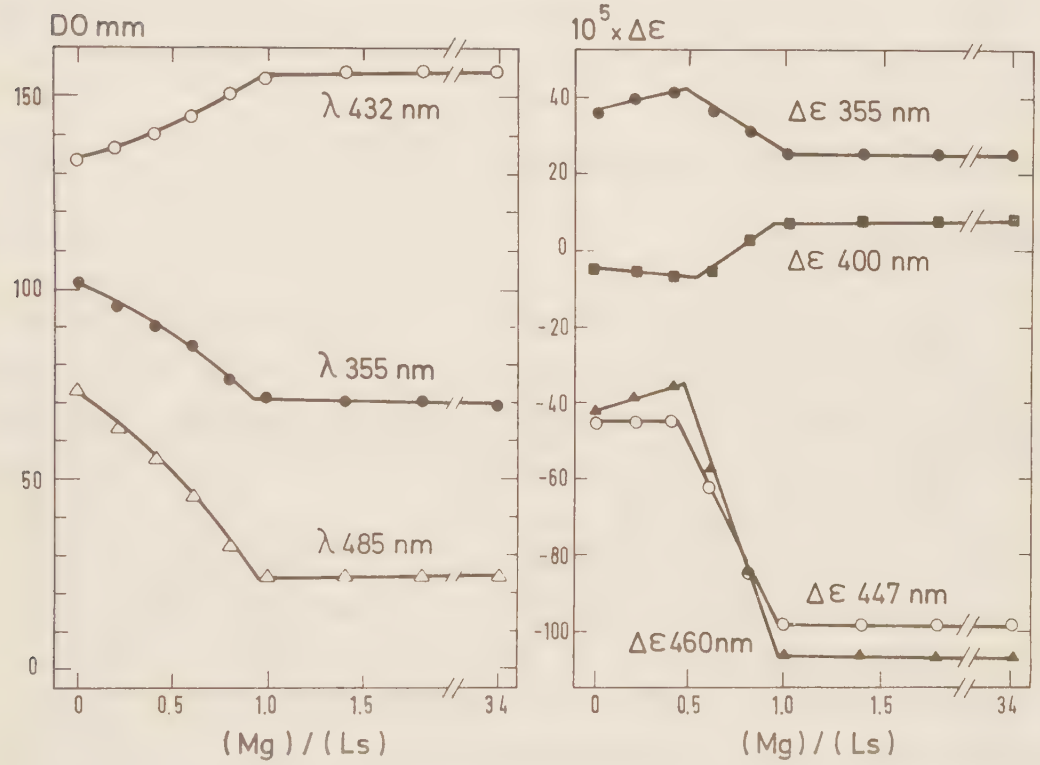


FIGURE 70 - Courbe supérieure : Spectres de DC des solutions de [Ls + poly(I)] + $MgCl_2$ pour 3 rapports r = Mg/Ls (-.-.- : r = 0 , --- : r = 0,45 ___ r = 4)

Courbe inférieure : Variations en fonction de r aux longueurs d'onde des maxima, de la densité optique (DO) et de DC ($\Delta\varepsilon$) , des solutions Ls + poly(I) + $(MgCl_2)$.

Cas de la rugulosine

Le titrage des ions Mg^{2+} (tampon phosphate pH 7,4 ; 0,1 M NaCl) du complexe poly(A)-Mg-Rg, complexe I le plus stable avec Rg, a été effectué en absorption et en DC (Fig. 71 et 72).

L'existence d'une série unique de points isobestes et d'une variation monotone de l'intensité spectrale en fonction du rapport Mg/Rg révèle l'existence d'une seule forme complexée contenant un ion Mg^{2+} par pigment (notons qu'à force ionique 0,1 M, NaCl la présence de complexe M avec Rg est dans ce cas négligeable). Les courbes de stoéchiométrie (Fig. 72) permettent d'estimer la valeur de la constante globale de formation du complexe I ($k_I \simeq 2$ à 5.10^7 $m^{-1}.l$).

En conclusion, la stoéchiométrie des ions divalents du complexe I est de 1 ion métallique par molécule de pigment.

b - Dosage des nucléotides puriques du complexe I

Lutéoskyrine

D'après les expériences antérieures (OHBA et FROMAGEOT, 1968), la quantité de résidus puriques présents dans le complexe I est comprise entre 1,5 et 2 (selon le pourcentage en G-C) dans le cas des ADN dénaturés par la chaleur (100°C, 30 mn, puis trempe à 0°C), et de 2 dans le cas du poly(A).

Nous avons choisi d'étudier l'association (Ls-poly I-Mg) en raison de la meilleure stabilité de ce complexe [comparée à celle des autres complexes I avec les AN_1]. Ajoutant d'abord le poly(I) en concentration donnée (variant de 2.10^{-6}M à 4.10^{-4}M) à différentes solutions de lutéoskyrine ($c = 2,3.10^{-5}$M) dans le tampon phosphate (pH 7,4 ; NaCl 0,01 M) puis le $MgCl_2$ (Mg/Ls = 4) nous avons suivi la variation des spectres DC en fonction de P/D (Phosphate/Pigment). Pour $P/D < 1$, il y a formation de poly-chélate qui précipite en fonction du temps. Pour $1 < P/D < 2$, les complexes II et I en mélange sont solubles. Pour $P/D > 2$, le complexe I est complètement formé et il n'y a plus de variation spectrale avec l'augmentation de la concentration en polymère.

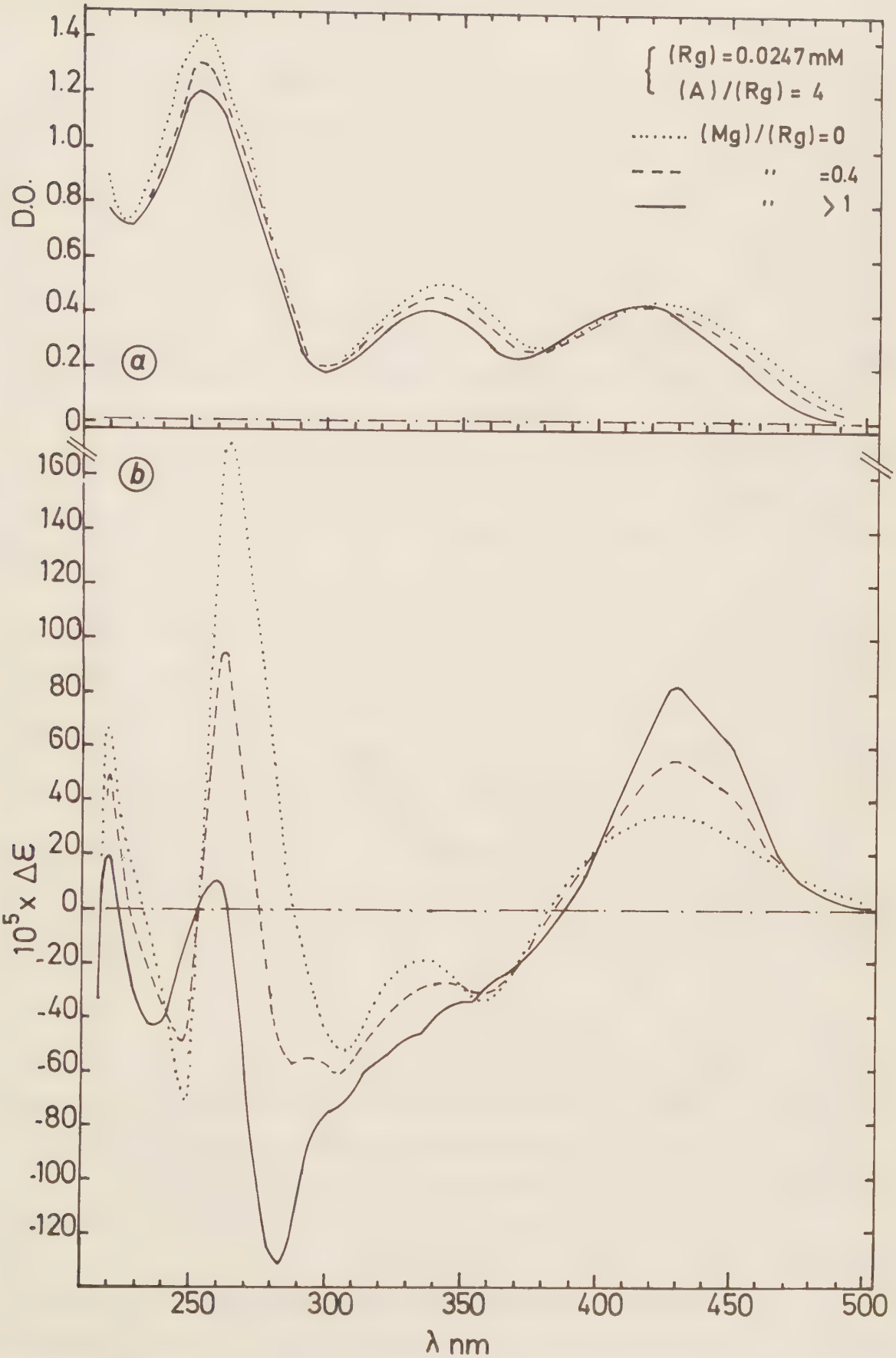


FIGURE 71 - SPECTRES D'ABSORPTION (a) ET DE DC (b)

des solutions de [Rg + poly(A)] et [Rg + poly(A)+Mg] à différentes concentrations dans le tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,4 ; 0,1 M NaCl).

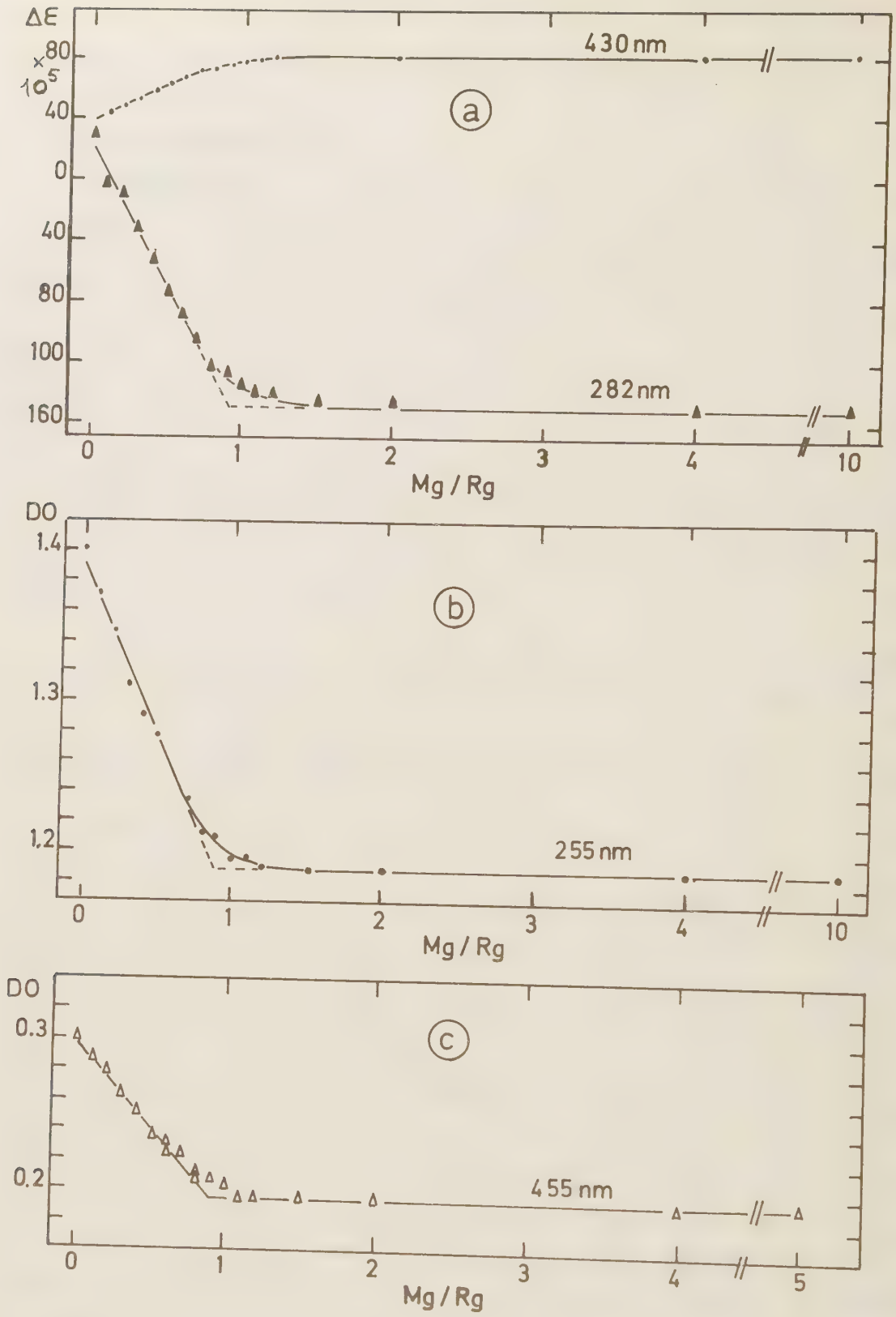


FIGURE 72 - STOECHIOMETRIE DU MAGNESIUM

Variations, en fonction de r = Mg/Rg, de l'amplitude dichroique (a) et de la densité optique (b et c), à des longueurs d'onde des maxima des spectres des solutions Rg + poly(A) +($MgCl_2$)

(Conditions expérimentales : voir figure 71)

Dans la figure 73a nous avons représenté les variations de DC à trois longueurs d'onde caractéristiques. La contribution du complexe I à l'effet Cotton étant négligeable à 490 nm, les spectres présentent à cette longueur d'onde un maximum révélant la présence de complexe II en quantité plus ou moins importante selon la valeur du rapport P/D . A 450 nm où la contribution à l'activité optique des deux complexes I et II est à peu près équivalente, la variation de $\Delta\varepsilon$ rend bien compte du phénomène : la présence d'au moins une purine par Ls est nécessaire pour que l'on puisse détecter la présence du complexe I.

La valeur du coefficient $\Delta\varepsilon_M$ du polychélate étant très faible à 470 nm, la variation observée à cette longueur d'onde est dûe essentiellement à la présence du complexe I. La stoéchiométrie obtenue est de Pu/Ls = 2.

Nous avons essayé de mesurer,à partir des spectres de DC, la constante d'association du complexe I par la méthode de SCATCHARD (1949). La méthode n'est applicable que si les sites correspondant aux différents équilibres envisageables sont indépendants d'une part et si l'on connaît pour chaque valeur du rapport P/D la valeur des concentrations des différents constituants en équilibre du mélange. Dans le cas de l'association Ls-Mg-poly(I) si l'on admet, en première approximation, que tout le pigment libre est transformé en polychélate d'une part et que le complexe II soluble et le polychélate plus ou moins précipité ont le même $\Delta\varepsilon_M$ d'autre part, on peut écrire :

$$C_{Libre} = C_{II} = C_0 - C_I$$

C_0 étant la concentration du pigment au départ (soit $C_0 \simeq D$)
C_L, C_I, C_{II} étant les concentrations respectives à l'équilibre de Ls libre du complexe I et du complexe II.

La concentration C_I peut être déduite des courbes expérimentales $\Delta\varepsilon_{Mes} = f(P/D)$ et l'on a :

$$\Delta\varepsilon_{Mes} = (\Delta\varepsilon_M)_I \times C_I + (\Delta\varepsilon_M)_{II}(C_0 - C_I)$$

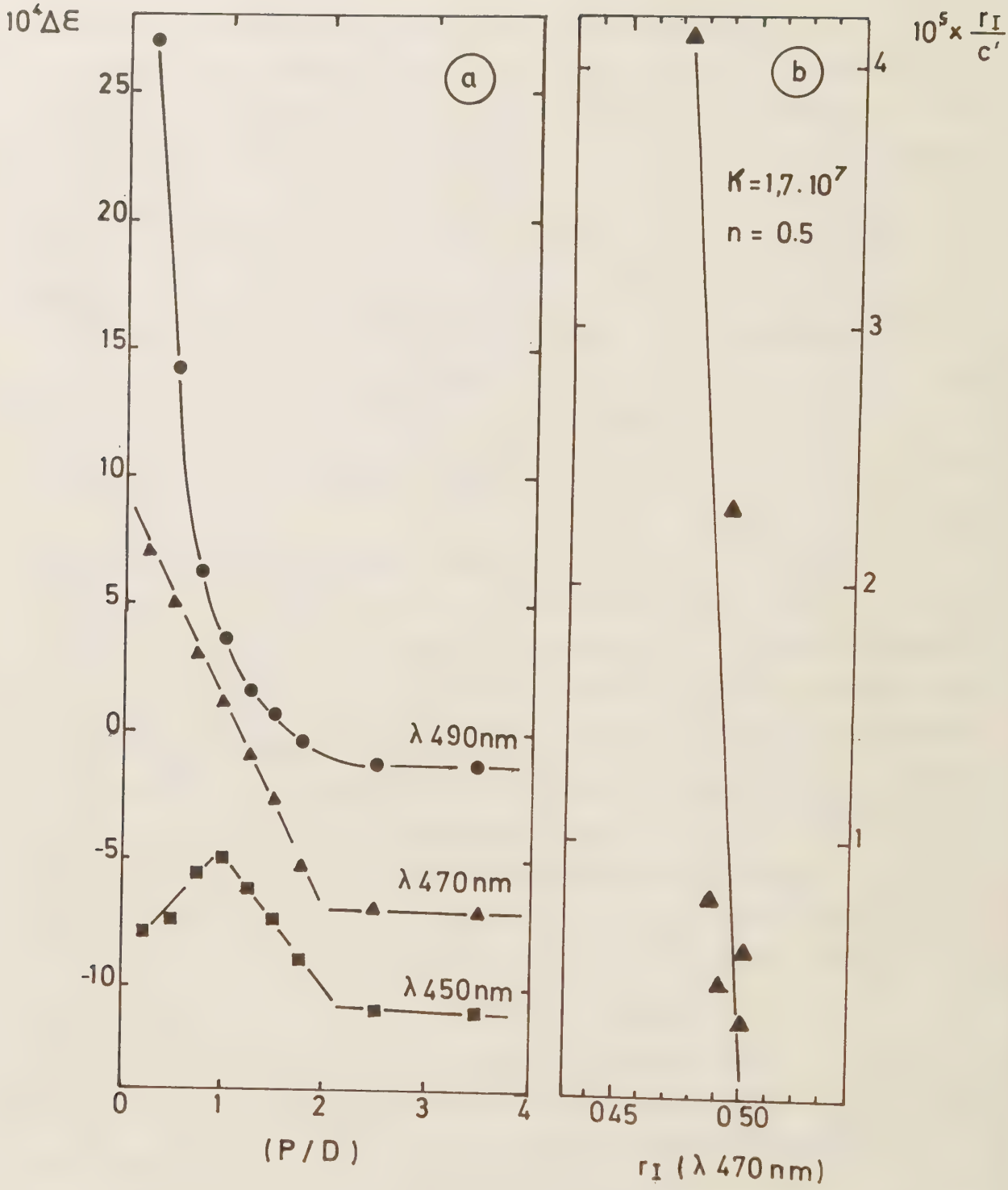


FIGURE 73 - DOSAGE DES BASES PURIQUES DU COMPLEXE Ls - Mg - Poly(I)

a) Variation en fonction du rapport phosphate/pigment, de l'amplitude de DC à 3 longueurs d'onde caractéristiques.

b) Courbe de Scatchard pour le complexe I.

$$\text{soit : } C_I = \frac{\Delta\varepsilon_{Mes} - (\Delta\varepsilon_M)_{II} \times C_0}{(\Delta\varepsilon_M)_I - (\Delta\varepsilon_M)_{II}}$$

Connaissant C_I il est alors possible de calculer

1) la fraction de complexe I formé soit $\alpha_I = \frac{C_I}{C_0} = \frac{C_I}{D}$

2) la quantité de pigment lié par nucléotide $r_I = \alpha_I \times \frac{D}{P}$

Dans le cas envisagé les valeurs des $(\Delta\varepsilon_M)_{470nm}$ sont les suivantes :

$$(\Delta\varepsilon_M)_{II} = 39\ M^{-1}.L.cm^{-1}\ ,\quad (\Delta\varepsilon_M)_I = -30{,}5\ M^{-1}.L.cm^{-1}$$

Remarquons que pour P/D = 0, la détermination de $(\Delta\varepsilon_M)_{II}$ est sans doute faussée par défaut, en raison de la précipitation du polychélate. Cette erreur est d'autant plus importante que la valeur mesurée est proche du maximum (à 495 nm) ; elle est par contre minimum à 470 nm où $\Delta\varepsilon_M \simeq 0$. A 470 nm, la courbe de SCATCHARD

$$\frac{r_I}{C_L} = k_I\,(n_I - r_I) \quad \text{correspond à l'équilibre}$$

$$\text{poly I} + Ls_{libre} \overset{(Mg^{++})}{\rightleftharpoons} \text{Ls - Mg - Poly I (complexe I)}$$

La droite obtenue (Fig.73 b) fournit le nombre de sites n = 0,5 (soit 2 nucléotides pour 1 pigment associé), et $k_I = 1{,}7.10^7$.

Pour préciser la valeur de la constante d'association il faudrait empêcher ou réduire le plus possible la précipitation du polychélate. Ceci est théoriquement possible en travaillant à force ionique suffisante mais pratiquement irréalisable puisqu'il faut tenir compte de l'autoagrégation du poly(I) même à P/D faible dans ces conditions, ($C_{NaCl} > 0{,}1$ M).

Il était donc préférable de poursuivre l'étude avec le système poly(A)-Rg-Mg, le poly(A) ne formant pas de structure secondaire à force ionique élevée ($C_{NaCl} < 1$ M) d'une part, le

complexe I ainsi obtenu présentant une stabilité maximum par rapport aux autres complexes I des AN_1 d'autre part.

Rugulosine

En présence d'ions Mg^{2+} à force ionique 0,1 M NaCl, la rugulosine forme avec le poly(A) les deux types de complexe I et II solubles (même après 5 heures). Selon la valeur donnée à poly(A)/Rg ou (P/D) la quantité de complexe I formé est plus ou moins importante : pour $0 < P/D < 3$ on obtient en mélange de pigment libre, polymère libre, complexe I et complexe II (ou polychélate) solubles. A la longueur d'onde $\lambda > 300$ nm la contribution du biopolymère à l'intensité d'absorption et de DC étant nulle, seuls les trois autres constituants sont à considérer. Pour $P/D = 0$ on a seulement l'équilibre entre pigment libre et polychélate. Pour $P/D \geq 3$, les spectres sont caractéristiques d'un complexe I et ne varient plus en fonction de l'augmentation de la concentration du polymère. Dans l'hypothèse 1°) de l'indépendance des sites de fixation des complexes I et II 2°) de l'identité des valeurs de $\Delta\varepsilon_M$ pour le polychélate et le complexe II, on peut écrire les équilibres parallèles (en excès d'ion $MgCl_2$)

$$Rg + Poly(A) + Mg^{2+} \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} \begin{matrix} \text{Complexe I} \\ \text{Complexe II} \end{matrix}$$

A une longueur d'onde donnée > 300 nm, l'intensité d'absorption visible ou de DC ne provient que de la contribution de Rg, I et II. Considérant la variation plus caractéristique des spectres CD, les équilibres ci-dessus permettent d'écrire :

$$\Delta\varepsilon_\lambda = (\Delta\varepsilon_{M,\lambda})_F \cdot C_F + (\Delta\varepsilon_{M,\lambda})_I \cdot C_I + (\Delta\varepsilon_{M,\lambda})_{II} \cdot C_{II}$$

avec $C_0 = C_F + C_I + C_{II}$

$(\Delta\varepsilon_{M,\lambda})_F$ = coefficient d'extinction différentielle molaire à la longueur d'onde λ , pour le constituant F

C_F, C_I , C_{II} = concentrations respectives du monomère libre (F), du complexe I et du complexe II.

C_0 = concentration totale en pigment.

Les coefficients $(\Delta\varepsilon_M)_{F,\ I,\ II}$ sont déduits respectivement des spectres limites du monomère libre, du complexe I et du complexe II.

On peut donc théoriquement déterminer, à n'importe quelle longueur d'onde, les concentrations C_F, C_I, C_{II} en décomposant à l'aide d'un calculateur la courbe expérimentale mesurée, en une combinaison linéaire des 3 spectres limites des 3 constituants.

En se limitant aux longueurs d'onde des points isobestes (λ_i et λ_j) correspondant aux équilibres 1 et 2 séparément (Fig. 74) le système peut être simplifié :

- Au point isobeste (i) entre la forme libre et le polychélate (II) on a :

$$\Delta\varepsilon_i = (\Delta\varepsilon_{M,i})_F \cdot (C_0 - C_I) + (\Delta\varepsilon_{M,i})_I\ C_I$$

soit :
$$C_I = \frac{\Delta\varepsilon_i - (\Delta\varepsilon_{M,i})_F \cdot C_0}{(\Delta\varepsilon_{M,i})_I - (\Delta\varepsilon_{M,i})_F}$$

- De même au point isobeste (j) entre la forme libre et la forme I on a :

$$C_{II} = \frac{\Delta\varepsilon_j - (\Delta\varepsilon_{M,j})_F \cdot C_0}{(\Delta\varepsilon_{M,j})_{II} - (\Delta\varepsilon_{M,j})_F}$$

Connaissant les valeurs :

C_0, $(\Delta\varepsilon_M)_F$, $(\Delta\varepsilon_M)_I$ et $(\Delta\varepsilon_M)_{II}$ on peut calculer C_I, C_{II} et C_F ainsi que $\sigma_F = \frac{C_F}{C_0}$, $\sigma_I = \frac{C_I}{C_0}$, $\sigma_{II} = \frac{C_{II}}{C_0}$

et $r_I = \sigma_I \frac{D}{P}$, $r_{II} = \sigma_{II} \frac{D}{P}$.

La relation de SCATCHARD relative aux deux équilibres ci-dessus s'écrit donc :

$$\frac{r}{C_F} = k_I\ (n_I - r_I) + k_{II}(n_{II} - r_{II}).$$

Connaissant r_I et r_{II}, on peut tracer séparément (DOURLENT et HELENE , 1971) les courbes $\frac{r}{C} = f(r)$ et en tirer les valeurs de n et k .

A partir des valeurs de $\overline{\Delta\varepsilon_M}$ ($\lambda i = 423$ nm, $\lambda j = 470$ nm) tirées des spectres limites (Fig. 74a) des formes F, I et II (Tableau 8), nous avons obtenu les courbes de σ_F , σ_I, σ_{II} et de SCATCHARD représentées sur la figure 74 : la droite relative au complexe I et la courbe de concavité dirigée vers l'axe des abscisses pour le complexe II sont caractéristiques respectivement de processus non-coopératif et coopératif (DOURLENT et HELENE, 1971).

TABLEAU 8

Valeurs des $(\Delta\varepsilon_M)_{i,\ j}$ des formes RG_F I et II

* Valeur limite extrapolée (polychélate agité, t = 15 jours, 37°C ; T. phosphate pH 7,4 ; 0,01 M NaCl).

λ nm / $\Delta\varepsilon_M$	i = 423	j = 470
RG_F	13,62±0,3	5,9 ± 0,1
RG_I	30,90±0,3	
RG_{II}		≃ 110*

Le nombre de sites obtenu est $n \simeq 0{,}31$ (3,23 bases par molécule de pigment), et la constante globale d'association du complexe I est de $k \simeq 1{,}7.10^7$, valeur identique à celle du complexe poly(I)-Ls-Mg.

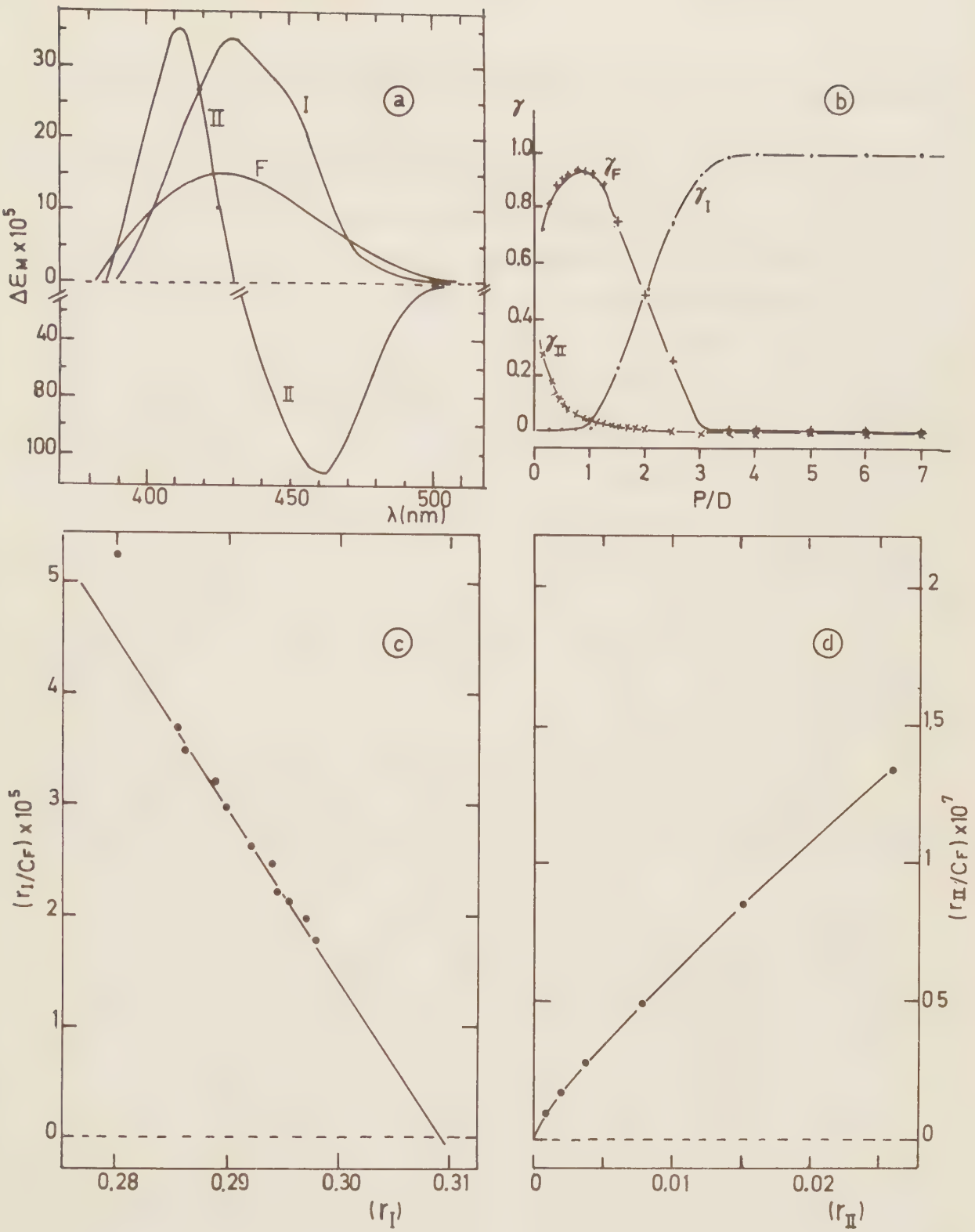


FIGURE 74 - DOSAGE DES BASES Pu DE Rg-Mg-poly(A)

a) Formes limites des spectres de DC de la rugulosine libre (F) en solution dans le tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,4 ; 0,1 M NaCl) ou complexée sous forme I ou II

b) Fractions σ des formes libres (F), ou complexées I et II en fonction du rapport poly(A)/Rg.

c,d) Courbes de Scatchard des complexes I et II

c - Variation de la concentration du pigment

Pour vérifier dans le cas du complexe I l'absence de coopérativité du plus proche voisin (pigment-pigment), nous avons étudié, P/D étant invariable, l'influence de l'augmentation de la concentration du pigment. S'il y a fixation coopérative du pigment on doit observer, en fonction de l'augmentation de D une diminution sigmoïdale du coefficient d'extinction molaire (SCHWARZ, 1970), la valeur limite (ε stack) étant caractéristique d'un empilement maximum. De cette variation d'$\varepsilon_{st.}$ on peut déduire le degré et la constante de coopérativité (SCHWARZ et al 1970, DOURLENT et HELENE 1971).

Nous avons enregistré les spectres d'absorption et de DC des solutions de [poly(I) + Ls + $MgCl_2$] dans le tampon phosphate 0,01 M, P/D = 3 , Mg/D = 20 , D = C_{Ls} variant de 3.10^{-6} à 7.10^{-4} (au-dessus de cette valeur il y a précipitation du polymère lors de l'addition de $MgCl_2$), utilisant des parcours optiques de 0,02 à 2 cm.

La valeur des coefficients $\Delta\varepsilon_M$ et ε_M des solutions à diverses longueurs d'onde, notamment aux longueurs d'onde caractéristiques du complexe I, est invariable quelle que soit la concentration utilisée comme le montre le tableau suivant :

TABLEAU 9

λ nm	10^{-3} x ε_M	$\Delta\varepsilon_M$
460	20,5 ± 0,5	48,0 ± 2
435	24,8 ± 0,8	33,0 ± 1,5
345	14,0 ± 1,0	10,0 ± 1,0

Les fluctuations des valeurs de ε_M et $\Delta\varepsilon_M$ mesurées aux différentes concentrations de pigment (D) sont de l'ordre de grandeur des erreurs expérimentales. Il n'y a donc pas de variation significative de ε_M de $\Delta\varepsilon_M$ et pas d'interaction directe mesurable entre plus proches voisins (pigment-pigment).

4) Stabilité du complexe I

a - Influence de la force ionique

Le complexe I ne se forme pas en l'absence d'ions divalents, même à force ionique élevée (1 M NaCl. En présence d'ions Mg^{2+}, l'influence de la force ionique dépend de la concentration du $MgCl_2$ présent :

Pour Mg/Pigment $\geq$ 20 , il n'y a aucune variation spectrale du complexe I : [poly(A)-Mg-Rg] en fonction de la concentration NaCl (variant de 0,01 à 0,5 M).

Pour Mg/Pigment $\simeq$ 1,5-4 , le complexe poly(A)-Mg-Rg se forme également mieux (15 %) à force ionique élevée (NaCl $\geq$ 0,1 M) qu'à force ionique faible (NaCl $\leq$ 0,01 M) lorsque les spectres sont enregistrés juste après mélange des réactifs ; après 17 heures d'incubation à 37°C, les spectres du complexe à différentes forces ioniques sont identiques. Avec la lutéoskyrine pour NaCl $\leq$ 0,01 M, le complexe [poly(A)-Mg-Ls] se transforme partiellement en complexe II (pic positif à 490 nm). Par contre pour NaCl $\geq$ 0,1 M, le complexe II est défavorisé. Le complexe I se forme avec une cinétique d'autant plus rapide que la concentration de $MgCl_2$ est plus élevée.

Ces résultats suggèrent d'une part que la fixation du Mg^{2+} est relativement forte, comme dans le cas d'une chélation par exemple ; et d'autre part que les ions divalents en excès stabilisent le complexe I, en formant d'autres liaisons entre pigments, ou entre pigment et biopolymère par exemple.

Si l'on ajoute de l'EDTA en excès par rapport au Mg, on dissocie le complexe I. A pH 7,4, la constante d'association de Mg - EDTA est de $\simeq 5.10^5$ (CHARLOT, 1966). Or la constante globale d'association des complexes I étudiés avec Ls ou Rg est supérieure à 10^7. Ceci suggère que la chélation du Mg^{++} n'assure pas à elle seule la stabilité du complexe I mais qu'il existe une contribution supplémentaire due à la liaison du pigment sur d'autres sites. On peut imaginer par exemple que le pigment fixé d'une part aux groupements phosphates par l'intermédiaire du Mg^{++}

se lie, d'autre part, aux bases puriques par intercalation ou par liaison hydrogène.

La formation et la décomplexation rapides du complexe I sont en outre en faveur d'une association du pigment sous forme monomère .

b - Influence de la température

La lutéoskyrine, associée à l'ADN de thymus de veau dénaturé par la chaleur, fait diminuer de 80 % l'hyperchromicité ($DO_{260\ nm}$) obtenue par chauffage (OHBA et FROMAGEOT, 1967). Le spectre de DC d'une solution de (Ls-Mg-AN_1) dans ces conditions révèlant en fait la présence dans la solution d'un mélange de complexes I et II (Fig. 65), nous avons étudié de préférence l'influence de la température sur la stabilité des complexes de Ls avec le poly(A) ou le poly(I).

T_M du complexe poly(A)-Mg-Ls

Le poly(A) monocaténaire (pH neutre) présente une déstabilisation progressive en fonction de la température due au désempilement non coopératif de bases (courbe 1 de la Fig. 75). Un chauffage du mélange [Ls + poly(A)] en l'absence de $MgCl_2$ entraine une variation progressive de l'hyperchromicité en fonction de la température. Cette variation est identique à celle que l'on obtient en chauffant du poly(A) seul. Par contre en présence de $MgCl_2$, le chauffage du complexe I bien formé (caractérisé par les spectres du visible) révèle une stabilisation importante du polymère associé (T_M voisin de 80°C) : on observe simultanément la transition poly(A) empilé $\rightleftharpoons$ poly(A) désempilé (dans l'UV) et la transformation complexe I $\rightarrow$ complexe II (dans le visible). Cependant, la transition du polymère est réversible alors que le complexe II formé à température élevée demeure inchangé après refroidissement : on voit en effet sur la figure 76 que le spectre du mélange chauffé puis refroidi est bien caractéristique du complexe II.

Un deuxième chauffage de ce même mélange (complexe II + poly(A)) montre (courbe 3 de la figure 75) que la variation de la DO_{256nm} est identique à celle du poly(A) seul en solution.

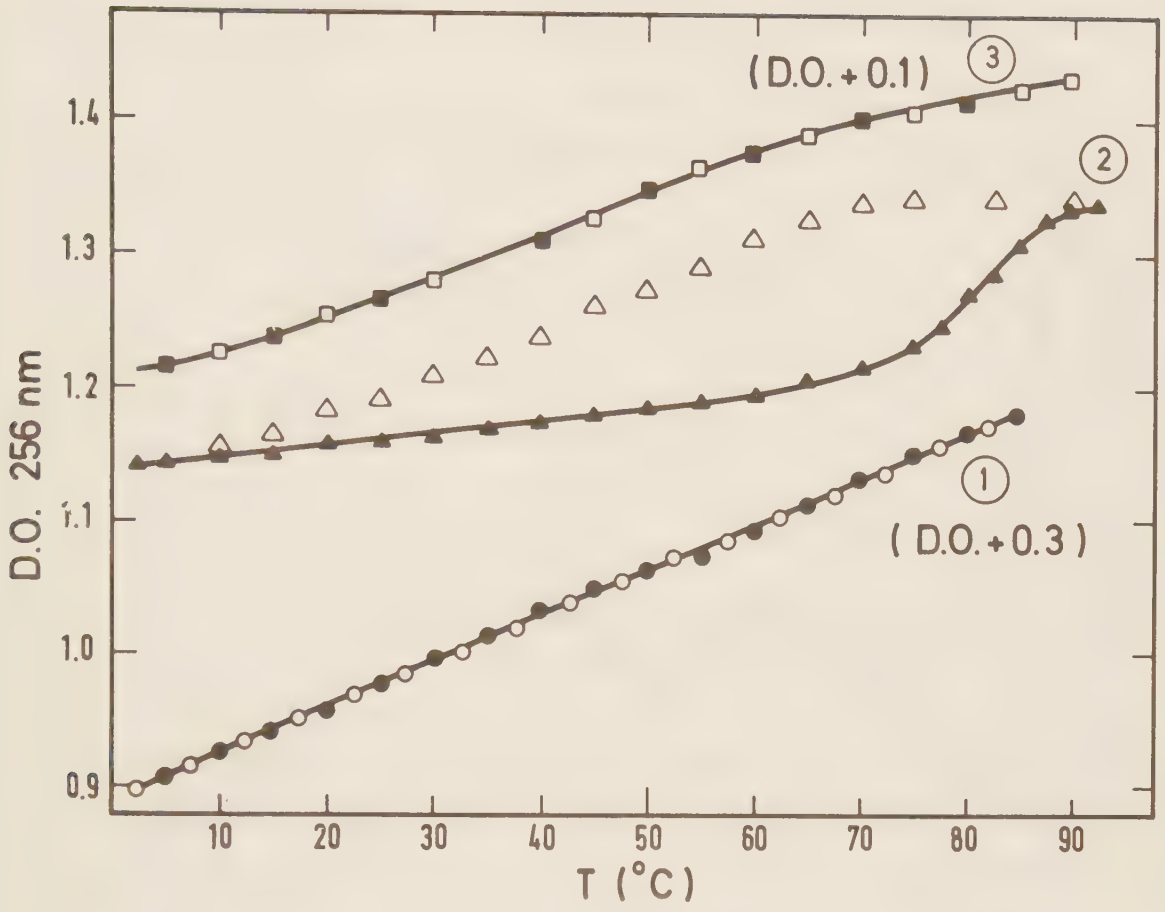


FIGURE 75 - COURBES DE FUSION DU Poly(A) et du [Poly(A)-Mg-Ls] . Variation en fonction de la température de la densité optique à la longueur d'onde du maximum (256 nm) de :

1) Poly(A) seul (0,072 mM) ou en présence de Ls (0,020 mM) dans le tampon cacodylate de sodium (0,01 M ; pH 7,2).
   -●- : chauffage , -o- : refroidissement

2) solution [Poly(A) + Ls] en présence de 0,15 mM $MgCl_2$
   -▲- : chauffage , -Δ- : refroidissement

3) Chauffage (-■-) et refroidissement (-□-) de la solution 2)

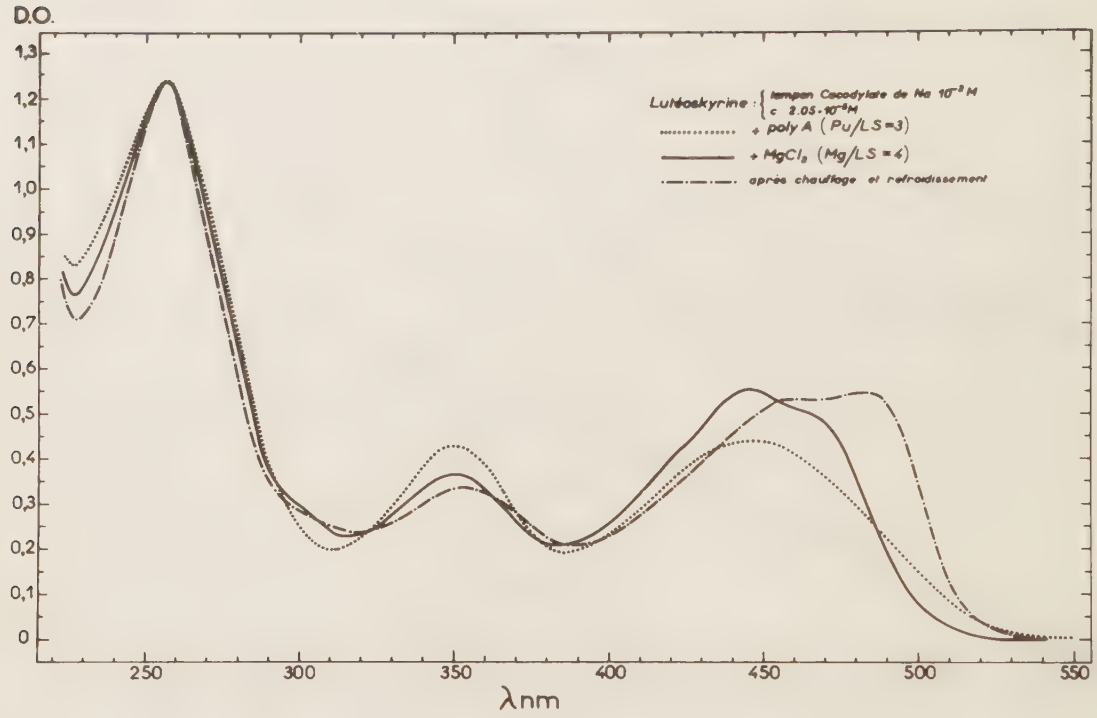


FIGURE 76 - SPECTRES D'ABSORPTION CARACTERISTIQUES DES COMPLEXES I (t = 20°C) et II (après chauffage à 90°C) ENTRE Ls , Poly(A) et $MgCl_2$.

D'autre part, en maintenant plus longtemps (30 à 45 mn) la solution du mélange (Ls + poly(A) + Mg) à 95°C lors du premier chauffage, on détache de l'ADN le polychélate qui précipite irréversiblement.

Nous avons calculé à partir des courbes de T_M la valeur de l'enthalpie $\Delta H°$ du complexe I, d'après la relation (MOORE, 1961) :

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \frac{\Delta H°}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$$

où K_1 et K_2 sont les constantes d'équilibre (de la réaction I $\rightleftharpoons$ II) aux températures T_1 et T_2.

$\Delta H°$: Enthalpie standard de la réaction, donnée par la pente de la courbe de Van't Hoff : $\log_n K = f(1/T)$

R : Constante des gaz parfaits = 2 kcal.mole^{-1} (MKSA)

La valeur trouvée est $\Delta H° = 16$ kcal.mole^{-1}.

La stabilisation du poly(A) ($\Delta H° = 7,8$ kcal.mole^{-1}, Van HOLDE et al, 1965) par la lutéoskyrine est comparable à celle provoquée par la proflavine ($\Delta H° = 15,8$ kcal.mole^{-1} d'après LI et CROTHERS 1969 a). Ce résultat suggère que la lutéoskyrine s'intercale entre les bases adénines.

T_M du complexe poly(I)-Mg-Ls

Le poly(I) présente une structure à 4 brins à force ionique élevée(>0,1M-voir chapitre I, 3ème partie). A force ionique 0,5 M NaCl et en présence de $MgCl_2$ (0,1 mM), la courbe de fusion du poly(I) (courbe 1, Fig. 77) présente deux pentes traduisant l'existence sur le biopolymère de deux types d'association, l'une non-coopérative ($T < 30$), l'autre coopérative ($30 < T < 40$). Le poly(I) présente donc simultanément des formes bien structurées (4 brins) et d'autres formes moins structurées (mono-brins empilés et doubles brins).

L'addition, à une solution (0,5 M NaCl) de poly (I), de Ls (P/D = 5,5) et de $MgCl_2$ (Mg/D = 5) donne lieu à une courbe de fusion à deux paliers (courbe 2, Fig. 77) : le premier palier correspond à la fusion de $poly(I)_4$ ($T_M \simeq 38°C$), le deuxième à celle du complexe I (contrôlé par absorption visible).

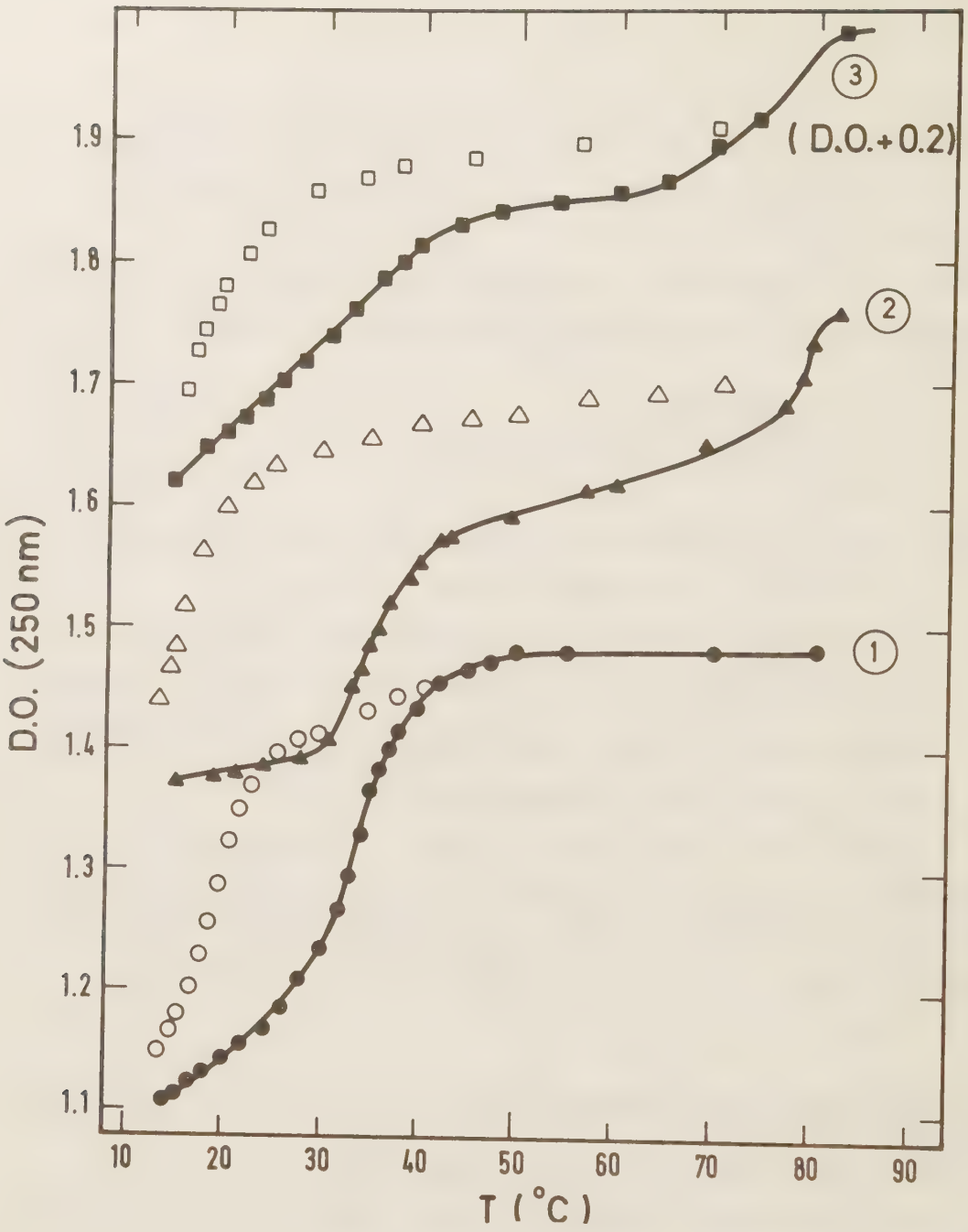


FIGURE 77 - COURBES DE FUSION DU poly(I) et du [poly(I)-Mg-Ls]

Variation, en fonction de la température, de la DO_{250nm} de

1) Poly(I) seul (0,13 mM) ou en présence de Ls (0,023 mM) dans le tampon (0,01 M ; pH 7,2 ; 0,5 M NaCl) -●- : chauffage ; -o- : refroidissement
2) Solution [poly(I) + Ls] en présence de $MgCl_2$ (0,12 mM) -▲- : chauffage ; -Δ- : refroidissement
3) Solution 2) soumise à un cycle de chauffage -■- : 2ème chauffage ; (□) : 2ème refroidissement.

Comme dans le cas du poly(A), le T_M du complexe (poly(I)-Ls-Mg) est bien supérieur au T_M du biopolymère seul.

A 90°C, tout le pigment est sous forme de complexe II. Contrairement au cas du poly(A) la transformation II $\rightleftharpoons$ I est réversible : par refroidissement le complexe I se reforme, la réversibilité est partielle à 70°C, et totale après 12 heures à 20°C. Un deuxième chauffage montre alors (courbe 3) une fusion moins coopérative néanmoins toujours en deux étapes.

Ces résultats indiquent : 1) que la fixation de Ls a lieu préférentiellement sur les zones monocaténaires du poly(I); 2) que la lutéoskyrine destabilise partiellement mais n'empêche pas la formation de la structure 4 brins du poly(I). Ces résultats sont également compatibles avec l'hypothèse selon laquelle le pigment serait fixé coopérativement en certaines zones du poly(I), une fixation statistique forte sur un grand nombre de sites étant peu compatible avec une réassociation en 4 brins lors du refroidissement.

Remarquons enfin que la lutéoskyrine pourrait être utilisée pour mesurer le degré d'hétérogénéité de l'appariement des acides nucléiques.

c - Influence du pH

Le domaine de stabilité en fonction du pH du complexe I: poly(I)-Mg-Ls est représenté sur la figure 78 : il n'y a pas de variation d'intensité spectrale aux longueurs d'onde caractéristiques du complexe (350 nm, 435 nm et 465 nm en absorption, 440 nm en DC) entre pH 6 et pH 11. La variation de la DO_{250nm} pour $pH > 9,5$ est dûe à la déprotonation du N_1H du poly(I) ($pK = 10,25$, MICHELSON et POCHON, 1966), excluant donc ce groupement comme site éventuel de fixation du complexe I. Pour $pH > 11$, le magnésium précipite sous forme d'hydroxyde entraînant probablement la déstabilisation du complexe I. En effet, à pH = 12, il n'y a plus de complexe et le spectre d'absorption ou de DC (Fig. 79) du mélange provient de la superposition des spectres des constituants isolés. Pour $pH < 7$, d'après la figure 78 , le pK_A du complexe est voisin de 5 (au lieu de 6,8 pour le pigment isolé). Cet abaissement du pK suggère que certains sites de protonation

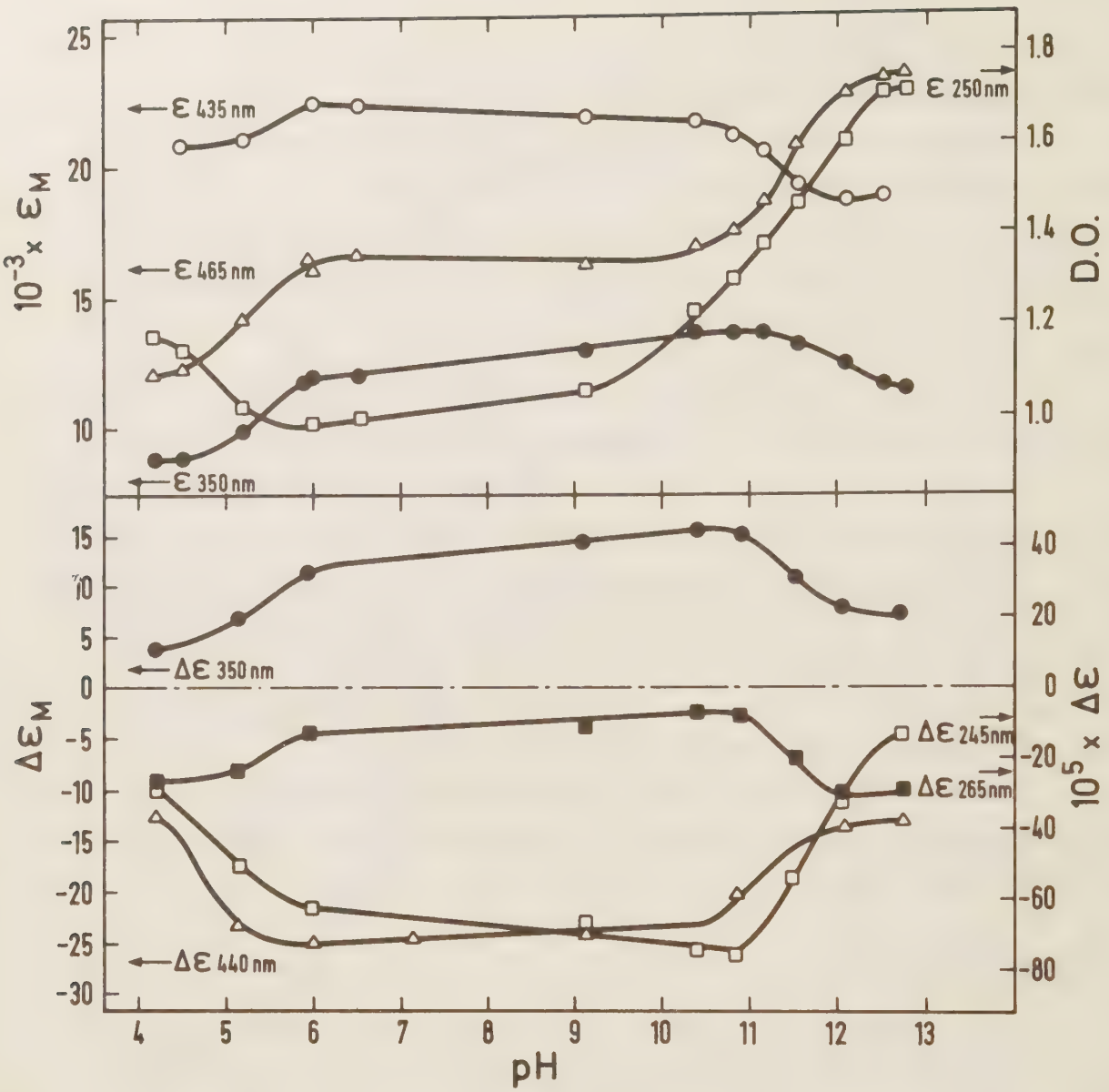
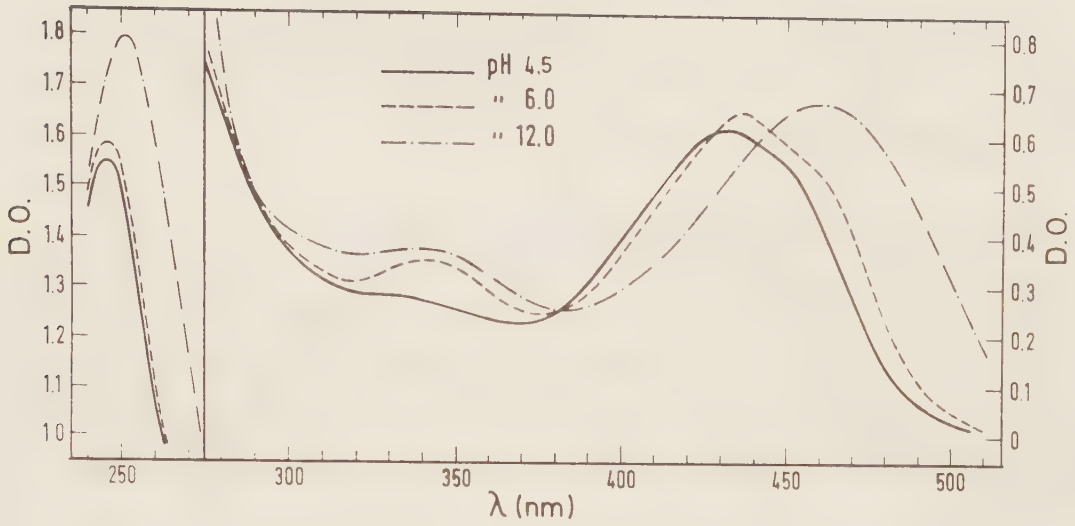


FIGURE 78 - STABILITE DU COMPLEXE I : [Ls-Mg-Poly(I)] EN FONCTION DU pH.

Variation de la densité optique et de l'amplitude de DC aux longueurs d'onde caractéristiques.

Pour chaque mesure, le pH de la solution stock de complexe I (volume initial ~ 50 ml) est ajusté par addition d'une microquantité d'acide (HCl 1 M) et mesuré à l'aide d'un pHmètre TACUSSEL-Isis-4000 ; les spectres sont ensuite effectués sur une partie aliquot (1,2 ml) prélevée du stock.



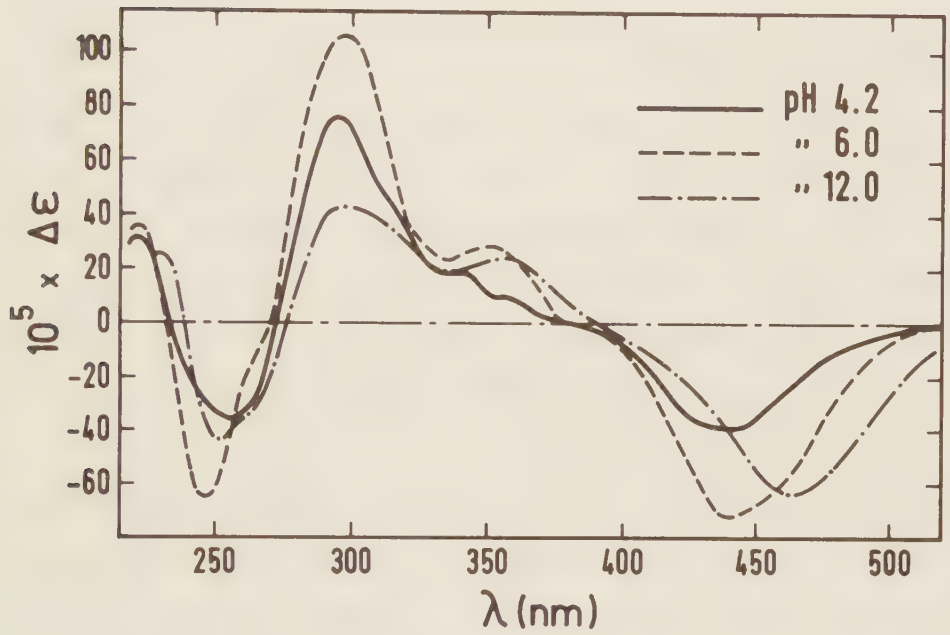


FIGURE 79 - SPECTRES D'ABSORPTION ET DE DICHROISME CIRCULAIRE DU COMPLEXE Ls-Mg-Poly(I) A DIFFERENTS pH .

du pigment (O_4 ou O_5) sont protégés par une fixation forte du Mg^{2+}. On ne peut préciser s'il s'agit de O_4 ou O_5, la structure électronique du chromophore étant vraisemblablement totalement perturbée par complexation au Mg.

Avec le poly(A), le complexe I : poly(A)-Mg-Ls est stable dans le domaine $7 < pH < 11$ (Fig. 80). Le pK_A du complexe (environ 6) est inférieur à celui du complexe I avec le poly(I). Cette stabilisation moins importante peut être dûe à la structuration partielle du poly(A) en double hélice aux $pH < 6,5$ et à faible force ionique (0,01 M NaCl) (GUSCHLBAUER et VETTERL, 1969).

5) Sites de fixation du polymère

a - Fixation au groupe phosphate

Le ligand considéré étant l'unité (Ls + Mg^{2+}), c'est vraisemblablement l'ion métallique positif qui se fixe d'abord au groupe PO_4^- de l'acide nucléique. Les ions divalents ont, en effet, une grande affinité pour ces groupes PO_4^- (constante d'association $k \simeq 10^5$, DAUNE 1970), ainsi qu'il ressort notamment des études de RMN ^{31}P (WYLUDA et al, 1963).

L'étude de RPE du complexe I : poly(I)-Mn-Ls nous conduit également à cette conclusion :

Nous avons suivi en fonction de la concentration de $MnCl_2$ (0,25 mM à 10 mM) à 20°C et à -150°C, la variation spectrale de RPE de solutions de poly(I) + Ls + Mn^{2+} C_{Ls} = 2,5 mM , (I)/Ls = 3 , dans le tampon pH 8,5 NH_4OH/NH_4Cl 0,1 M. Pour $Mn/Ls \leq 0,8$ on n'observe qu'une seule raie large ($\sim$1000G, à -150°C) correspondant à la formation du complexe I (contrôlée en absorption et DC). Pour $Mn > 0,9$ il y a apparition de $MnCl_2$ libre en solution (6 raies hyperfines à 20°C, une raie $\sim$ 500G à -150°C comme dans le cas du contrôle [$MnCl_2$ + poly(I)]. La comparaison à partir de la largeur de la raie (Δ H), de la distance (r) entre ions Mn(II) voisins (voir 2ème partie) des complexes I et II donne :

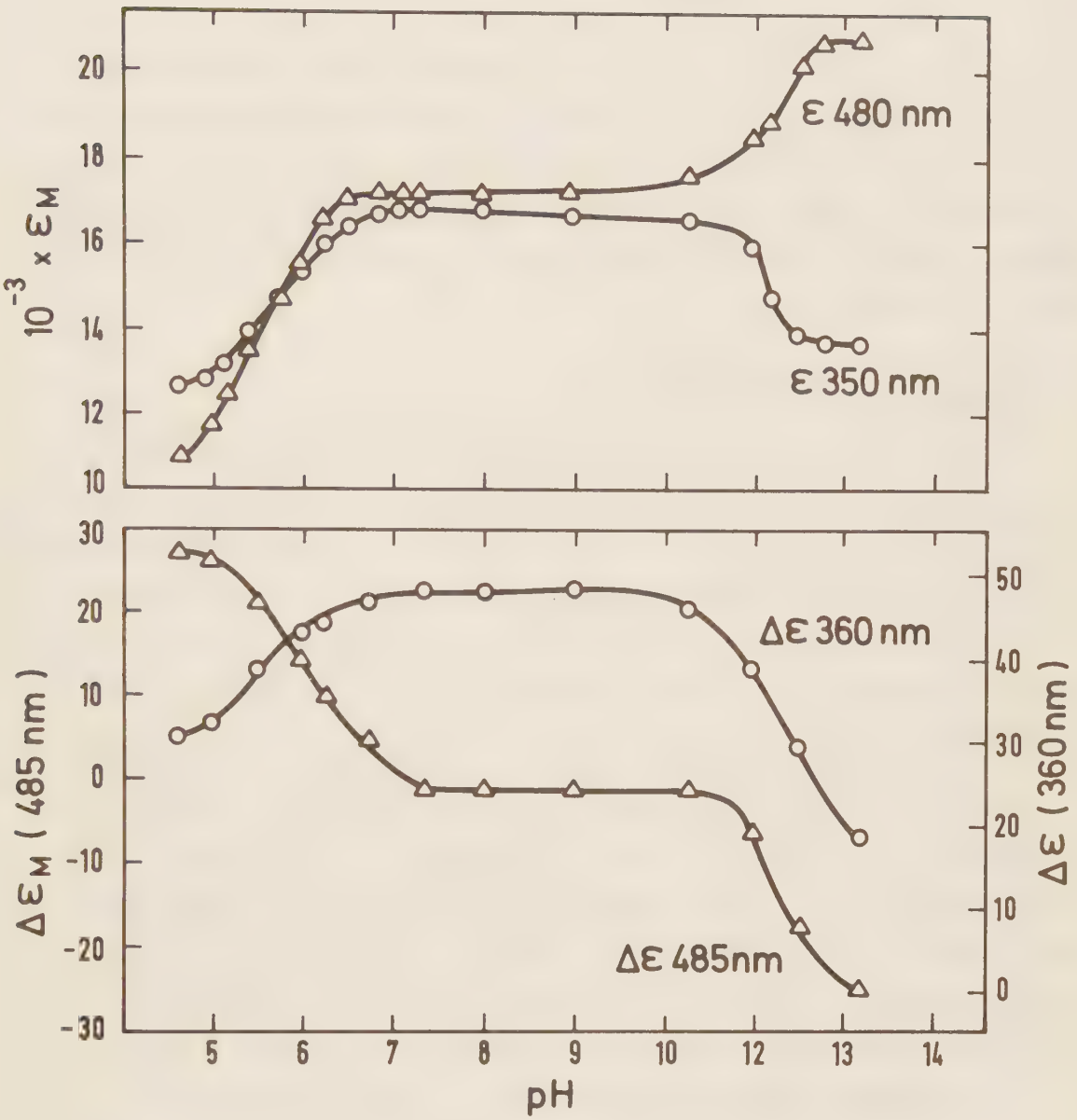


FIGURE 80 - STABILITE DU COMPLEXE I : [Ls-Mg-Poly(A)] EN FONCTION DU pH.

(Mêmes conditions expérimentales que celles de la Fig. 78).

$$\frac{r_{II}}{r_I} = (\Delta H_I/\Delta H_{II})^{1/3} = (1000/750)^{1/3} \simeq 1,1$$

En prenant $r_{II} = 7$ Å (modèle du polychélate), la distance $r_I = 6,4$ Å obtenue est équivalente à celle comprise entre les groupes PO_4^- des ARN par exemple (WILSON, 1973). Il est donc raisonnable de penser que les groupes phosphate de AN_1 sont les premiers sites de fixation des ions divalents lors de la formation du complexe I.

b - Fixation aux bases puriques

La nécessité de la présence de bases puriques pour la formation du complexe I suggère l'existence de liaisons entre la base et l'unité (pigment - ion divalent). La dissociation instantanée du complexe I (constante d'association $\simeq 2.10^7$) par l'EDTA (constante d'association $k \simeq 5.10^5$ avec l'ion Mg^{2+}) suggère également l'existence d'autres liaisons que Mg^{2+}, entre le pigment et le biopolymère.

Le problème est de savoir si les pigments s'associent aux bases par "intercalation" ou bien par fixation spécifique, par liaison H par exemple, sur les sommets 1 (N ou NH), 6 (NH_2 ou C=O) ou 7 (N) de la base purique. Pour cela nous avons essayé de "protéger" les sites de fixation des bases soit en les méthylant, soit en les engageant dans des liaisons H par formation des hélices doubles ou multiples de biopolymère.

1. Méthylation du poly(I)

Nous avons méthylé le poly (I) en N_7 (par ICH_3) et en N_1 et N_7 (par Me_2SO_4) par la méthode de MICHELSON et POCHON (1966). L'identification et la pureté du poly (N_7 MeI) et poly (N_1 N_7 diméthyl I) ont été contrôlées par spectroscopie d'absorption (MICHELSON et POCHON, 1966), et par chromatographie sur papier (FINK et ADAMS, 1966) après hydrolyse acide des polymères méthylés.

Les spectres d'absorption et de DC des figures 81 et 82 montrent que la méthylation en N_7 défavorise mais n'empêche pas la formation de complexe I alors que la méthylation à la fois en N_1 et N_7 abolit la formation de complexe I.

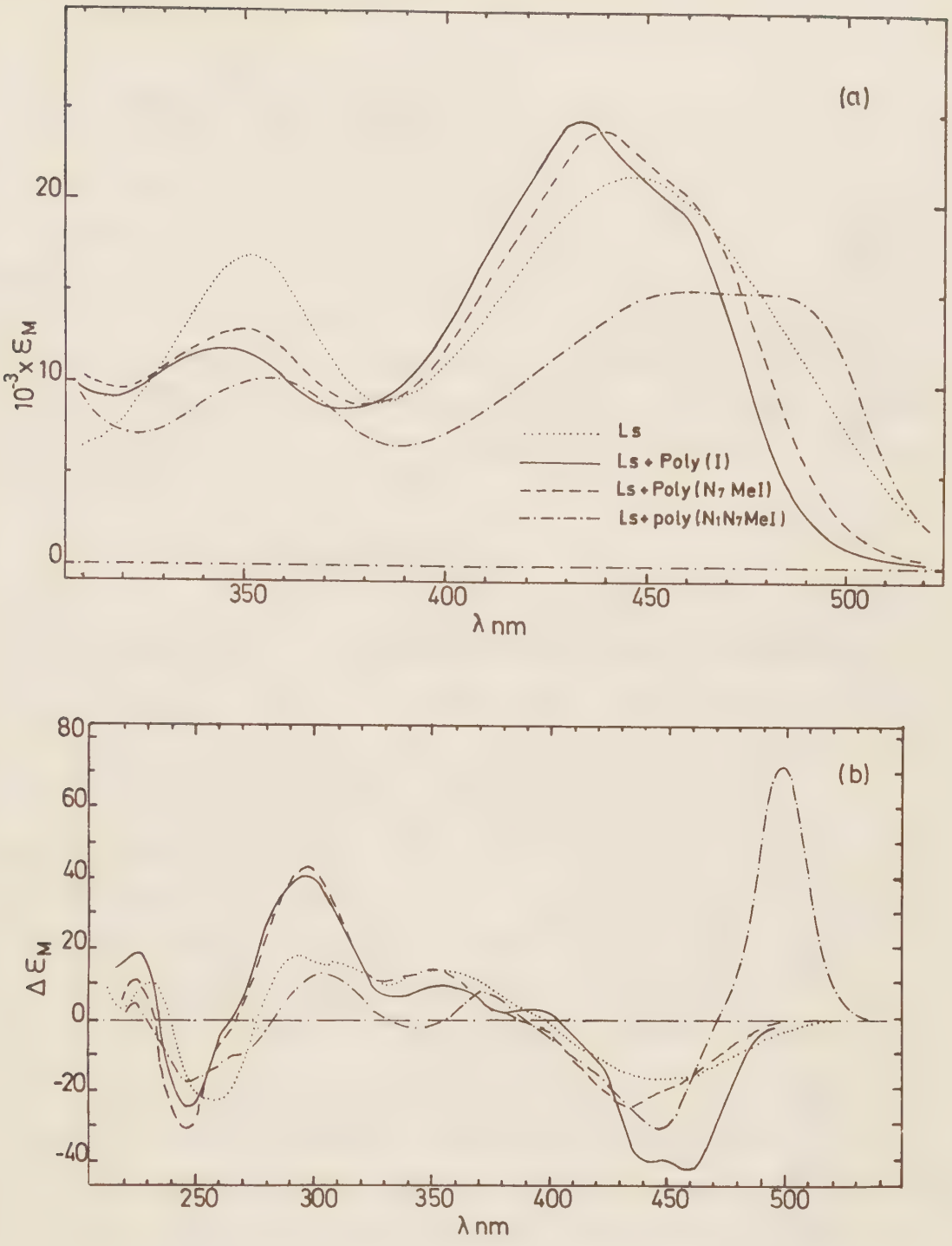


FIGURE 81 - COMPLEXES ENTRE Ls ET LE Poly(I) METHYLE

Spectres d'absorption (a) et de DC (b) des solutions dans le tampon cacodylate de sodium (0,01 M ; pH 7,2) de :

..... : lutéoskyrine (0,030 mM)
_____ : lutéoskyrine + poly(I) [P/D = 4] + $MgCl_2$ (1 mM)
- - - : lutéoskyrine + poly(N_7MeI) + $MgCl_2$ "
-.-.- : lutéoskyrine + poly(N_1N_7 diMeI) + $MgCl_2$ "

L'intensité des bandes DC des polymères, très faible devant celle du pigment, a été négligée.

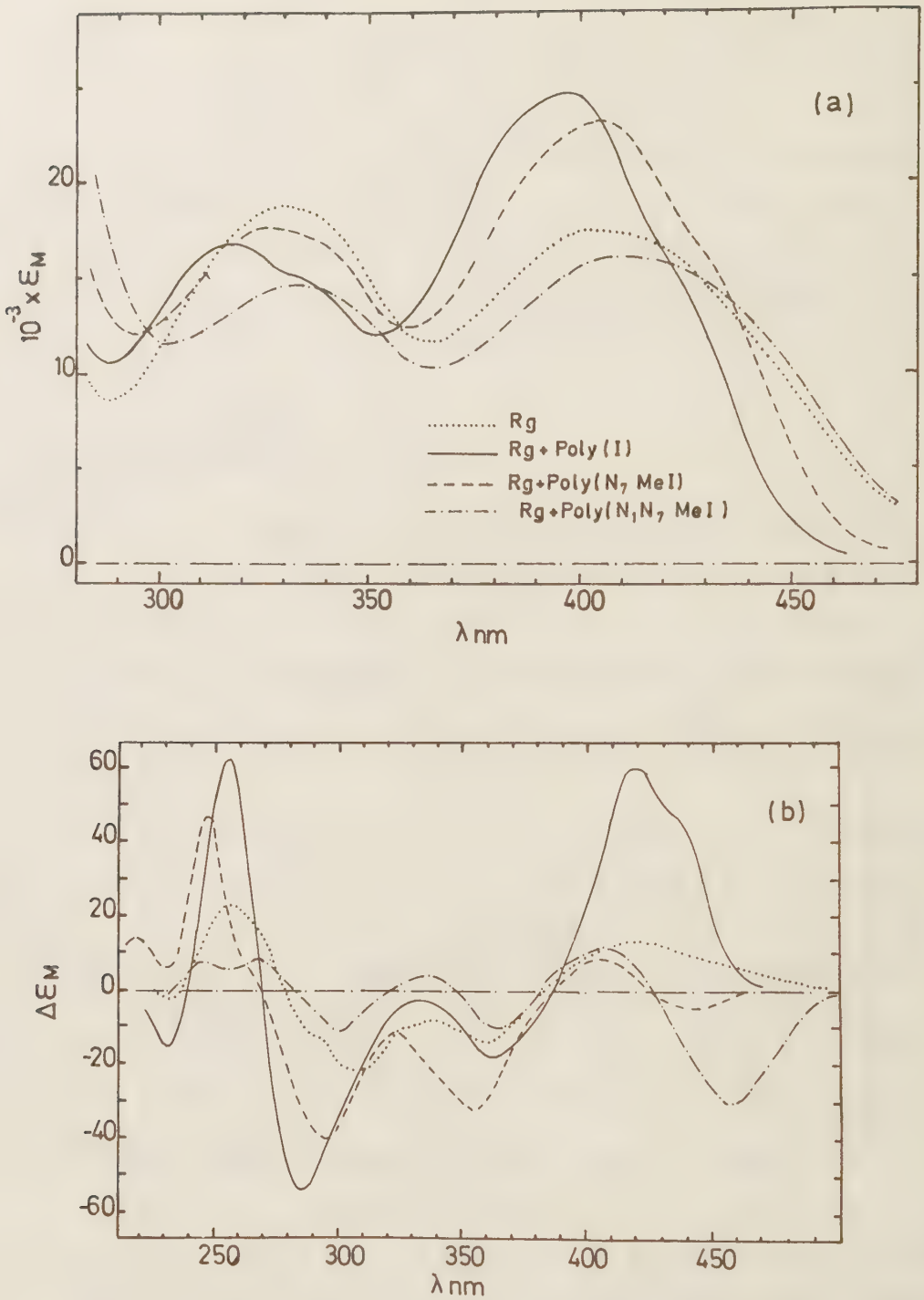


FIGURE 82 - COMPLEXES ENTRE Rg ET LE Poly(I) METHYLE.
(Rg = 0,027 mM, mêmes conditions expérimentales que celles de la figure 81).

Ces résultats indiquent que le groupe N_7 n'est pas indispensable à la formation du complexe I mais qu'il est un facteur important de stabilisation. La méthylation simultanée des groupements N_1 et N_7 peut empêcher la formation du complexe I soit parce que le N_1 est un site essentiel de fixation du complexe, soit en raison de la charge positive globale de la base résultant de la diméthylation du poly(I) (MICHELSON et POCHON, 1966). On ne sait malheureusement pas méthyler sélectivement le N_1 du poly(I), c'est pourquoi nous avons poursuivi cette étude avec le poly(A) méthylé.

2. Méthylation du poly(A)

Nous avons méthylé le poly(A) en N_1 par le sulfate de méthyle (MICHELSON et GRUNBERG-MANAGO, 1964). Le pourcentage de méthylation est estimé à 70 % d'après l'analyse chromatographique des produits d'hydrolyse acide (FINK et ADAMS, 1966). La figure 83 représente les spectres des complexes de Ls (a, b) et de Rg (c, d). Ces spectres indiquent l'absence de polychélate ou de complexe II. Les complexes du type I formés avec les pigments sont cependant peu solubles dans l'eau. La fixation du pigment au polymère méthylé soluble à l'état isolé augmente donc le caractère hydrophobe de ce polymère. Ces résultats montrent que le groupe N_1 du poly(A) n'est pas impliqué dans la formation du complexe I.

Nous avons également préparé du poly (N_6 Me A) à partir du poly (N_1 MeA) (MICHELSON et GRUNDBERG-MANAGO, 1964). Le poly (N_6 Me A) forme également des complexes I avec Ls et Rg en présence d'ion $MgCl_2$. Ces complexes sont solubles et présentent des spectres semblables à ceux des complexes avec le poly (N_1 Me A).

En conclusion, les groupes N_1 et $(NH_2)_6$ du poly(A) ainsi que le groupe N_7 du poly (I) ne sont pas directement impliqués dans la formation du complexe I. La participation éventuelle des groupes $(NH)_1$ et $(CO)_6$ du poly(I) peut encore se vérifier par protection de ces groupes par formation de polymère multibrin.

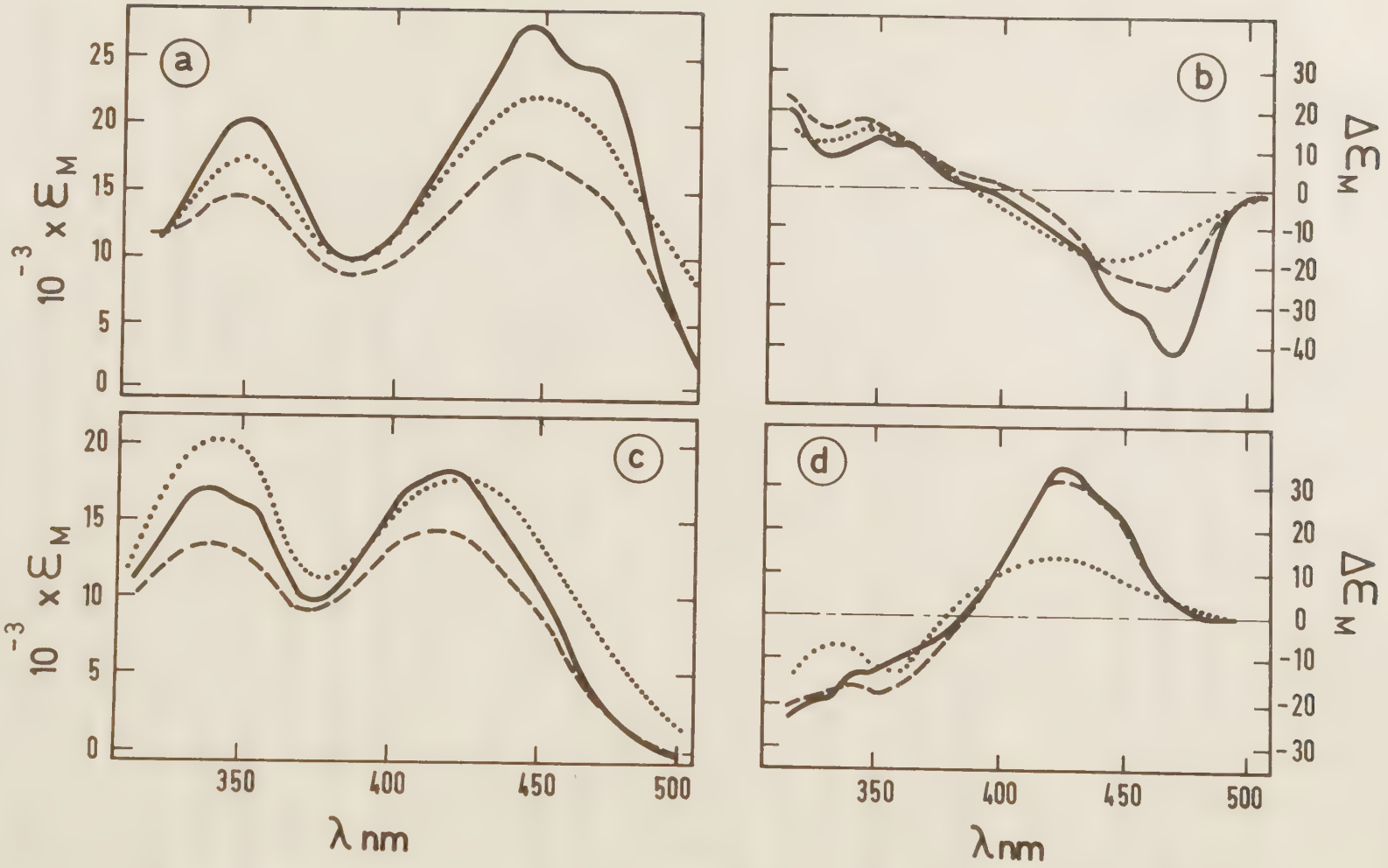
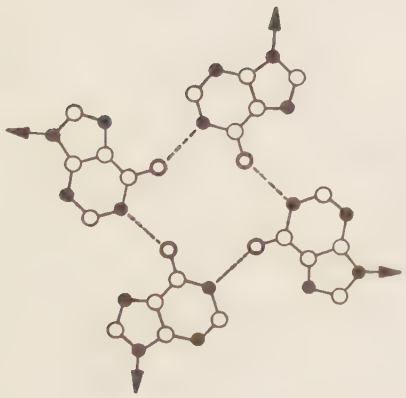


FIGURE 83 - COMPLEXES AVEC LE Poly(A) METHYLE.

Spectres d'absorption et de DC des solutions dans le tampon phosphate (0,01M; pH 7,4) de Ls (a,b) et Rg (c,d). .... : pigment seul (C_{Ls}=0,030mM, C_{Rg}=0,035mM)
——— : pigment + Poly(A) [P/D ≃4] +$MgCl_2$ (1mM)
- - - : pigment + Poly(N_1 Me A) [P/D ≃ 4] + $MgCl_2$(1mM) (le complexe formé précipite)

3. Interaction entre pigment et poly(I) multibrin



Appariement des bases du poly(I) multibrin.

A force ionique élevée (> 0,5 M NaCl) le poly(I) formerait une super-hélice droite à 4 brins parallèles, reliés entre eux par des liaisons H entre les CO_6 et NH_1 (Figure ci-contre, d'après THIELE et GUSCHLBAUER, 1973).

La figure 84 montre que l'augmentation de la force ionique (donc de la structuration du poly I) n'empêche pas la formation du complexe I avec Ls ou Rg. On note cependant une diminution de l'intensité des spectres DC (dont l'allure est toujours caractéristique d'un complexe I, même pour NaCl = 1 M) et une précipitation lente du complexe I à 1 M NaCl.

Ces résultats montrent que les groupements CO_6 et NH_1 du poly(I) ne sont pas indispensables à la formation du complexe I [pigment-Mg-poly(I)].La diminution d'asymétrie semble révéler que la formation du "multibrin" défavorise celle du complexe I.

4. Influence du poly(C) sur les complexes I : poly(I)-Mg--pigment

Nous avons ajouté du poly(C) en quantité croissante à des solutions de complexes I :[poly(I)-Mg-Ls] et [poly(I)-Mg-Rg] [poly(I) = 0,100 mM, C_{Ls} = 0,030 mM, C_{Rg} = 0,027 mM, $MgCl_2$=1mM].

En absorption, on ne voit aucune variation dans la région visible (suggérant que le pigment reste fixé sur le poly(I) sous forme de complexe I); dans l'UV (Fig. 85), alors que l'on retrouve bien l'association 1/1 en l'absence de pigment, on n'a plus qu'un rapport $\frac{(I)}{(C)} \simeq 0,5$ en présence de complexe I.

En dichroisme circulaire, on observe par contre des variations de l'ensemble du spectre (UV + visible). La figure 86 représente les spectres DC dans la région du visible pour 4 rapports (I)/(C) ; les variations de $\Delta\varepsilon$ à des longueurs d'onde données, montrant une stoéchiométrie fluctuant de 0,5 à 1,5, sont représentées dans la figure 87.

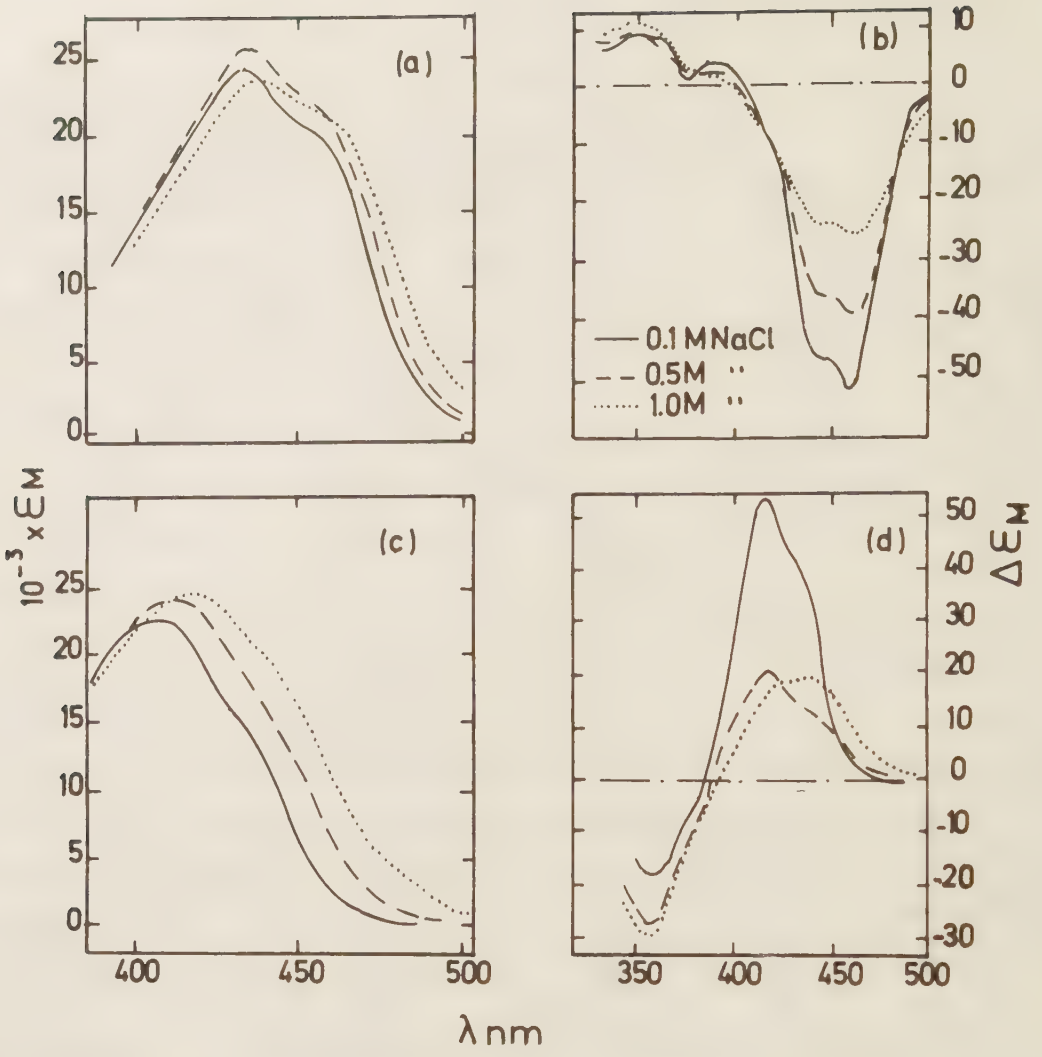


FIGURE 84 - COMPLEXES AVEC LE Poly(I) MULTIBRIN.

Spectres d'absorption et de dichroisme circulaire (région du visible) des solutions de Ls (a,b) et de Rg (c,d) en présence de poly(I) multibrin et de $MgCl_2$ (1 mM). La formation de poly(I) multibrin soluble est obtenue après 48 h à 4°C.

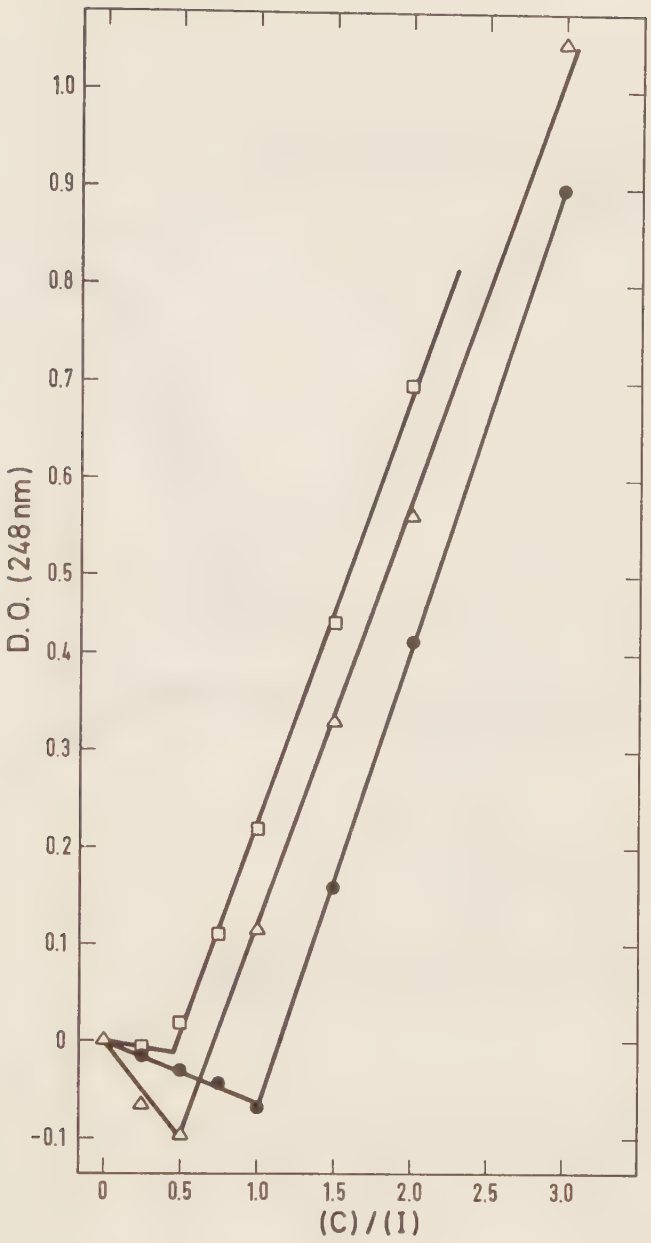


FIGURE 85 - VARIATION EN FONCTION DU RAPPORT Poly(C)/Poly(I) de la DO_{248} des spectres (différentiels) des mélanges dans le tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,4)

-●- : [Poly(I) + $Poly(C)_x$] - Poly(I)

-Δ- : [Poly(I) - Mg - Ls + $Poly(C)_x$] - Poly(I)

-□- : [Poly(I) - Mg - Rg + $Poly(C)_x$] - Poly(I)

Les concentrations utilisées sont : Poly(I) : 0,110 mM

Ls : 0,030 mM

Rg : 0,027 mM

$MgCl_2$: 1 mM

Poly(C) : concentration variable

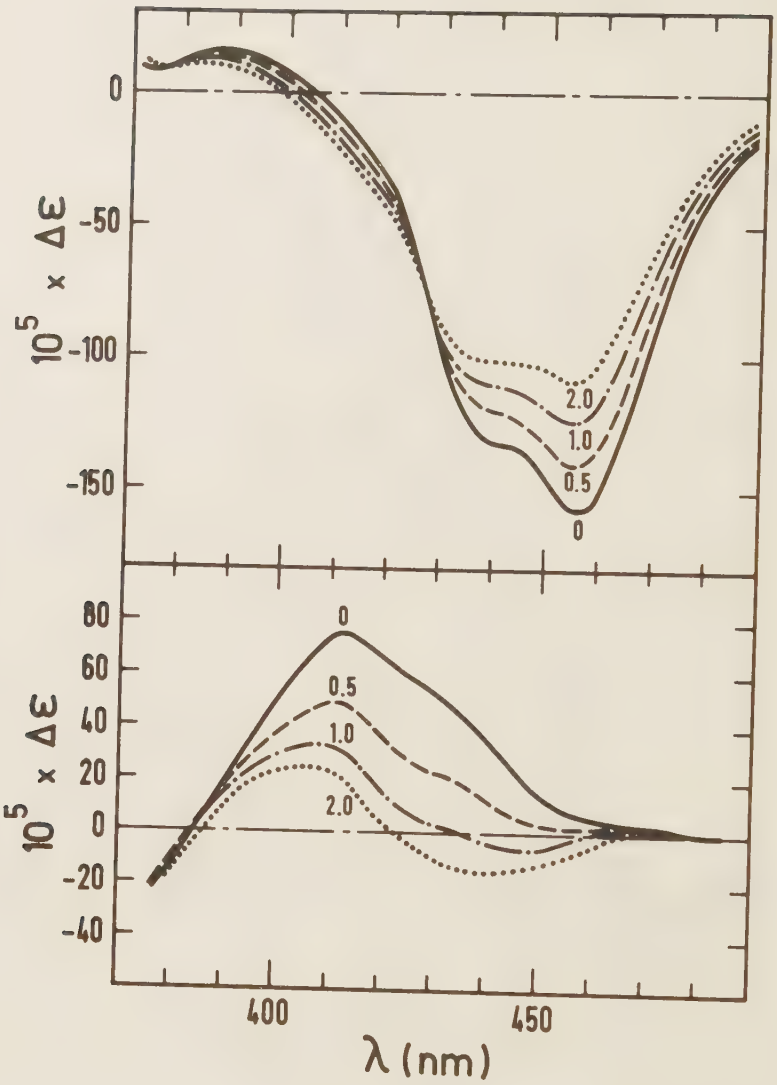


FIGURE 86 - SPECTRES DE DICHROISME CIRCULAIRE
des mélanges :
- Poly(I)-Mg-Ls + Poly(C) : courbes supérieures
- Poly(I)-Mg-Rg + Poly(C) : courbes inférieures

Les rapports (C)/(I) sont reportés sur les courbes.

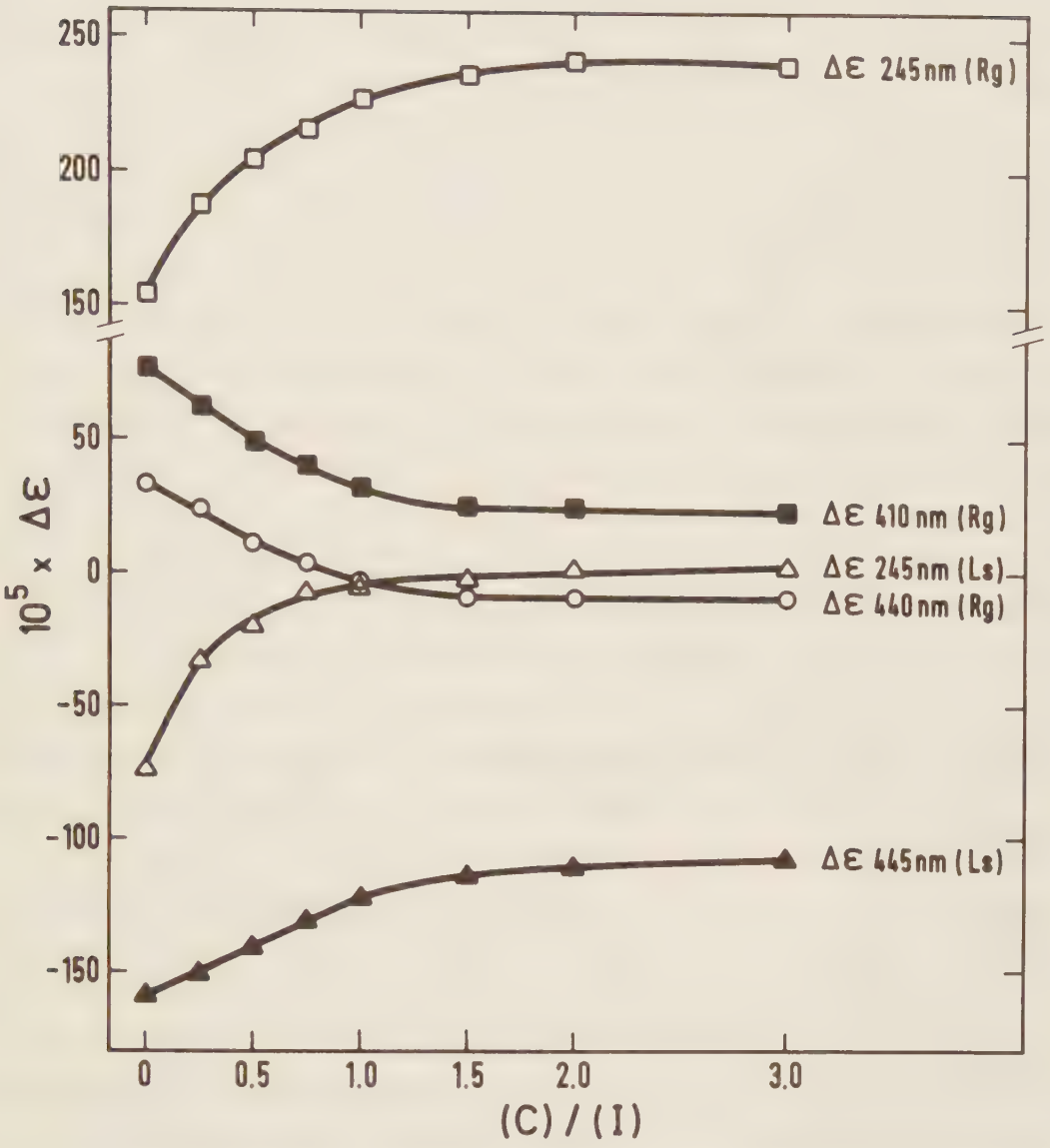
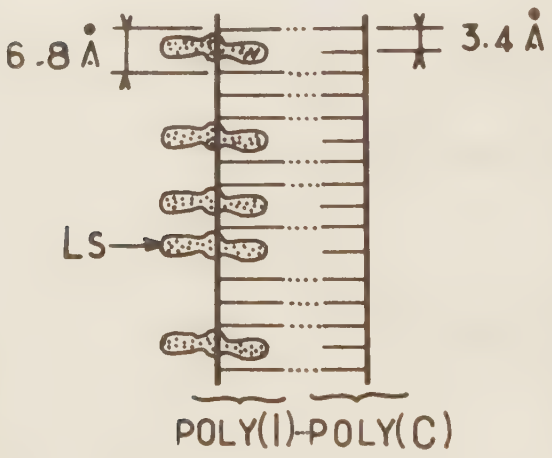


FIGURE 87 - INFLUENCE EN DC DE L'ADDITION DE Poly(C) AUX SOLUTIONS DES COMPLEXES : [Ls-Mg-Poly(I)] et [Rg-Mg-Poly(I)] dans le tampon phosphate (0,01 M) à pH 7,4.

La variation de $\Delta\varepsilon_M$ dans le visible avec l'addition de poly(C) indique une perturbation de l'asymétrie du complexe, suggérant une fixation du poly(C) sur les brins de poly(I) associé au pigment. Dans l'hypothèse d'une fixation statistique, le rapport Ls/poly(I) $\simeq$ 3,5 utilisé, suppose une occupation de la moitié des sites du poly(I) (stoéchiométrie Pu/Ls = 2); on imagine mal comment le pigment occupant une proportion aussi importante des sites $CO_{(6)}$ ou $NH_{(1)}$ du poly(I) puisse permettre encore l'association en double brin du poly(C) poly(I). Par contre la fixation du poly(C) est possible si le pigment est simplement intercalé entre les bases. Dans le cas d'une fixation statistique de ce type, en raison de l'écartement des bases du poly(I) résultant de l'intercalation du pigment, la réassociation du poly(C) nécessiterait une stoéchiométrie de 3 bases (C) (écartement 2 x 3,4 Å) pour 2 bases hypoxanthines (écartement 3,4 Å + Ls ($\simeq$ 3,4 Å)) conformément au schéma ci-contre :



La formation de poly(I).poly(C) modifiant les facteurs géométriques du complexe[poly(I)-Mg-Ls]formé préalablement (et en particulier le recouvrement entre la base (I) et le pigment) serait responsable de la diminution de l'intensité dichroique observée. En absorption l'intercalation produit de même une hyperchromicité par rapport au spectre du poly(I) isolé. L'hypochromicité supplémentaire provoquée par l'association ultérieure du poly(C) en double brin [poly(I)-Mg-Ls].poly(C) est moindre que celle provoquée par l'appariement direct poly(I).poly(C), conformément aux observations faites à 248 nm. L'hypochromicité de l'appariement complexe I - poly(C) est donc la somme des hypochromicités dues à l'intercalation et à la réassociation (I-C) . Remarquons que le poly(I).poly(C) formé avant addition de Rg donne lieu, lors de l'addition de ce pigment et de Mg^{++}, à la formation de complexe II, suggérant que l'espace entre les bases empilées dans une structure secondaire AN_2 n'est pas favorable à une intercalation.

D'autres observations sont encore en faveur d'un tel processus d'intercalation : On sait que le Mn^{++} peut former un pontage entre le phosphate et le N_7 de la base empêchant ainsi l'intercalation. Le remplacement du Mg^{++} par le Mn^{++} provoque en effet une diminution nette de la stabilité du complexe I. L'inhibition très faible provoquée par l'augmentation de la concentration en NaCl est également en faveur d'une intercalation (ICHIMURA et al, 1969).

Notons qu'avant de s'intercaler le pigment doit sans doute être déjà fixé sur l'acide nucléique par la chaîne polyphosphate (comme dans le cas des acridines d'après LI et CROTHERS, 1969). Nous avons voulu voir si les quinones aromatiques hydroxylées, telles que le chrypsophanol et l'émodine, étaient susceptibles de s'associer aux différents AN_1 et AN_2 déjà envisagés (paragraphe 2, P/D $\simeq$ 4) en présence ou même en absence de $MgCl_2$ à 2 pH 7,5 et 11 (pK des quinones $\simeq$ 10). En aucun cas nous n'avons décelé l'existence de complexe avec les acides nucléiques - ni immédiatement après mélange des réactifs, ni après incubation prolongée (15 heures à 23°C).

6) Sites de fixation du pigment

Nous avons vu que l'unité (Ls + Mg) se fixe au poly(I) ou au poly(A) d'une part sur les groupes phosphate , d'autre part entre les bases. Ces liaisons impliquent d'une part une fixation du Mg^{2+} au pigment et d'autre part une interaction de la région plane du pigment avec les bases.

a - Fixation de l'ion divalent

On sait qu'à pH neutre, les $CO^-_{44'}$ et les $CO^-_{55'}$ symétriques 2 à 2 du pigment sont déprotonés. Les $CO^-_{44'}$ proches de la cage centrale sont les plus basiques, d'autre part le complexe I se forme immédiatement après addition du $MgCl_2$. Ces résultats suggèrent un mode de fixation préférentiel de l'ion divalent au niveau de la cage (contrairement à celui du polychélate). Plusieurs arguments expérimentaux confirment cette hypothèse :

1 - Les résultats de dichroisme circulaire magnétique (PHAM VAN et al, 1974) suggèrent une fixation différente de l'ion divalent sur le pigment dans les complexes I et II : les signaux opposés des spectres de DCM (Fig. 88) de ces deux complexes révèlent que les directions de polarisation du moment de transition correspondant à la bande d'absorption visible des deux complexes sont perpendiculaires (directions C = O_9 - CO_5^- pour le complexe II et C = O_9 - CO_4^- pour le complexe I par exemple).

2 - La présence de complexe M mélangé à du complexe I pour Mg/Ls $<$ 0,5 (étude de la stoéchiométrie du Mg^{++}) peut s'expliquer ainsi : Après accrochage d'une molécule de pigment à la chaîne polyphosphate et intercalation partielle de cette molécule entre 2 bases puriques, le CO_5^- libre peut encore être relié à une deuxième molécule de pigment isolé, par l'intermédiaire d'un deuxième atome de Mg^{++} (processus secondaire rappelant celui d'un début de polychélation).

3 - L'ion Mg^{2+} fixé à la cage centrale serait mieux protégé de la compétition des ions Na^+.

4 - L'utilisation des analogues : bis-anthraquinoniques sans cage centrale comme la skyrine (pK = 7,6 et 10,8) d'une part (Fig. 2) ou anthraquinoniques plans comme l'émodine d'autre part, révèle que dans les deux cas malgré l'existence de complexes [pigment - Mg^{2+}] (à pH $\geq$ 10) il n'y a pas, en présence d'ions divalents , association de ces analogues avec les acides nucléiques mono (ou bi)caténaires. La présence de la cage imposant des facteurs géométriques favorables (distance optimum CO_{10}-CO_4^-) est donc nécessaire.

b - Fixation de la partie aromatique

L'absence, sur les purines, de groupements fonctionnels essentiels à la formation du complexe I, le comportement du complexe I vis à vis du poly$(I)_4$ ou du poly(I).poly(C), ainsi que la stabilité thermique du complexe I sont en faveur de l'hypothèse d'une intercalation de la partie aromatique du pigment entre les purines. Dans ce cas, l'environnement du pigment associé doit être partiellement (1 seule moitié) hydrophobe.

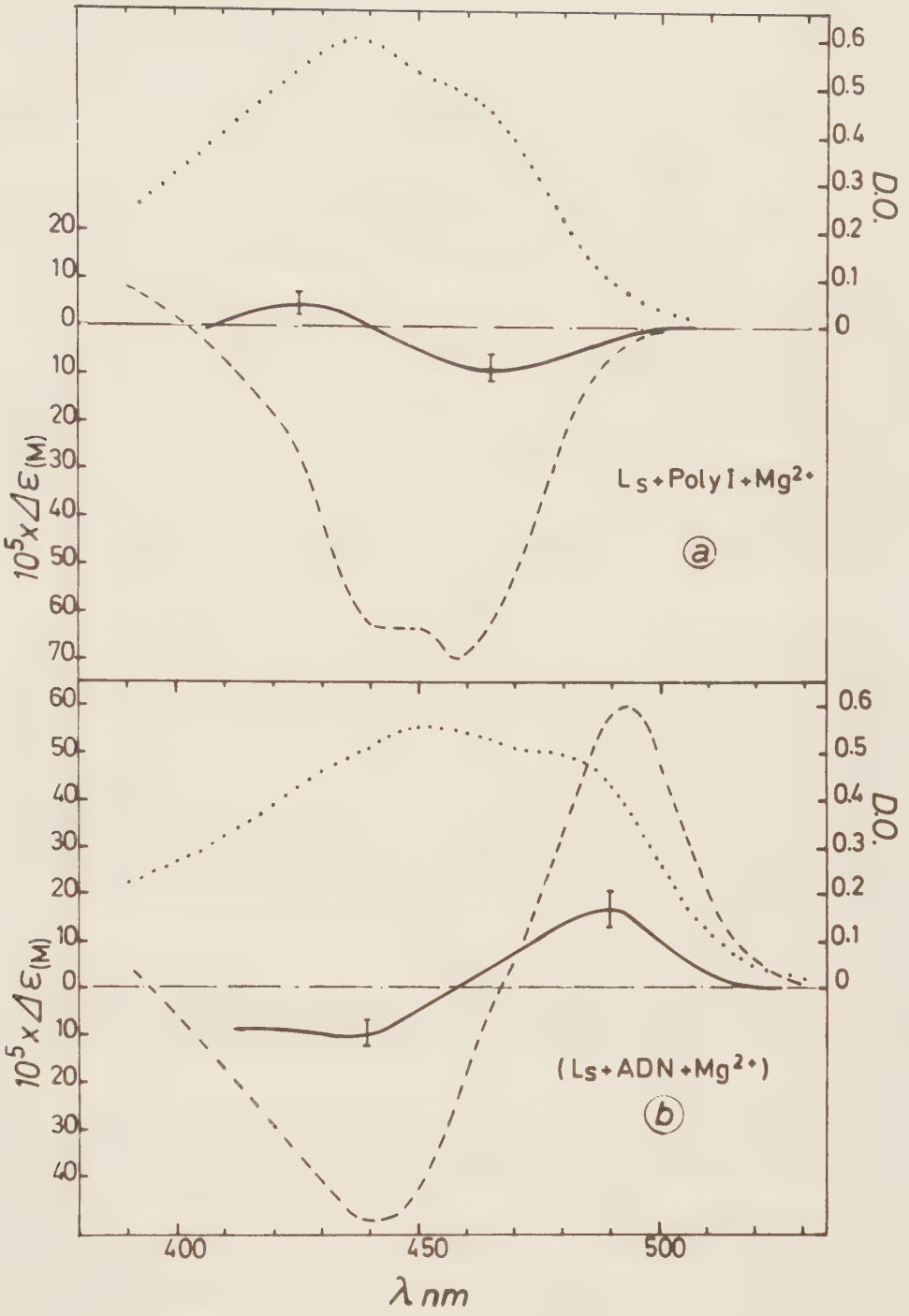


FIGURE 88 - Spectres d'absorption (....), de dichroisme circulaire (----) et de dichroisme circulaire magnétique (——) des solutions dans le tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,2 ; t = 20°C) de [Ls (0,028 mM) + poly(I) (0,110 mM) ou ADN de thymus de veau (0,140 mM)+ $MgCl_2$ (0,1 mM) .

La comparaison des spectres d'absorption et de DC du complexe I (Figure 89) avec ceux de la molécule isolée en solution dans le CCl_4 montre en effet :
1) que le spectre d'absorption du complexe I est intermédiaire entre ceux de la molécule libre en solution aqueuse et en solution organique , 2) que le spectre de DC du complexe I est semblable à celui du pigment isolé en solution dans le CCl_4 et enfin que l'augmentation d'intensité spectrale du complexe I par rapport à celle du pigment isolé provient vraisemblablement d'une asymétrie plus grande de l'environnement du pigment engagé entre 2 bases.

De même qu'en DC , la formation du complexe I Ls-Mg-poly(I) s'accompagne d'une augmentation de l'intensité de fluorescence du pigment (Fig. 90) comparable à celle provoquée par élévation du pourcentage de solvant organique (PHAM VAN, 1968). Le complexe I fluoresce vers 480 nm comme le pigment isolé en solution organique. En conclusion l'environnement du pigment est plus hydrophobe à l'état de complexe I qu'à l'état isolé en solution aqueuse.

7) Nécessité d'une stabilisation (supplémentaire) du complexe I

Le complexe I se forme plus vite en présence d'un excès de $MgCl_2$ suggérant une stabilisation supplémentaire qui peut se faire de deux façons :
- soit que le Mg^{++} en excès chélate le N_3 de la base et le CO_5^- du pigment favorisant la superposition de la base purique et du colorant (d'après le modèle ces 2 groupements N_3 et CO_5^- sont en effet proches dans l'espace).(Cf Fig 92 c et d)
- soit que le Mg^{++} en excès relie directement deux molécules de pigments voisins associés au biopolymère : le Mg^{++} serait engagé avec une couche d'hydratation éventuelle entre les deux moitiés, extérieures au biopolymère, appartenant à deux molécules de pigment voisines.

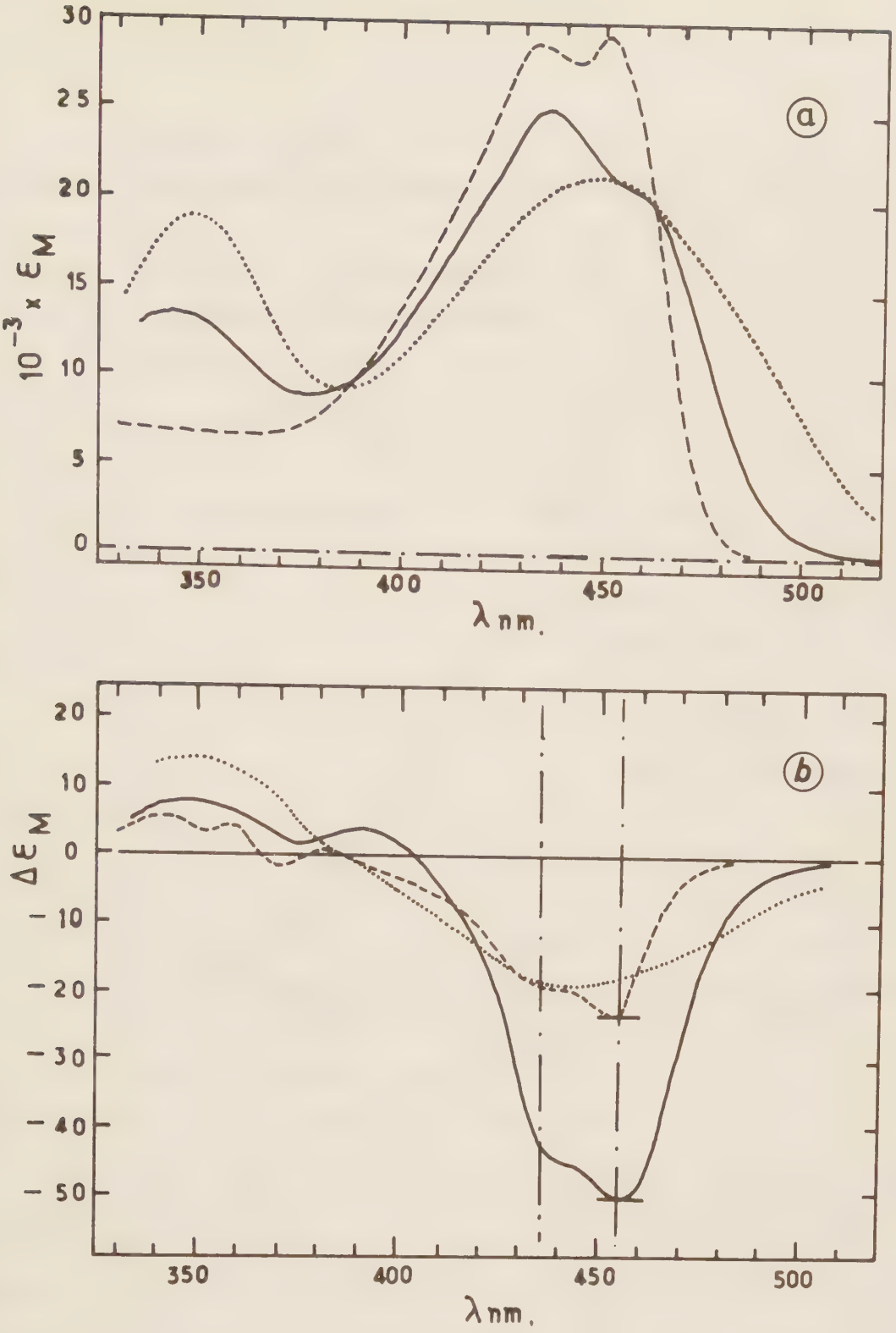


FIGURE 89 - SPECTRES D'ABSORPTION a) ET DE DICHROISME CIRCULAIRE b) de solutions :

——— de complexe Ls-Mg-Poly(I) dans le tampon phosphate à pH 7,4 (report des figures 64 et 65).

..... de Lutéoskyrine dans le même tampon (pH 7,4).

------ de Lutéoskyrine dans le CCl_4 (report de la figure 5).

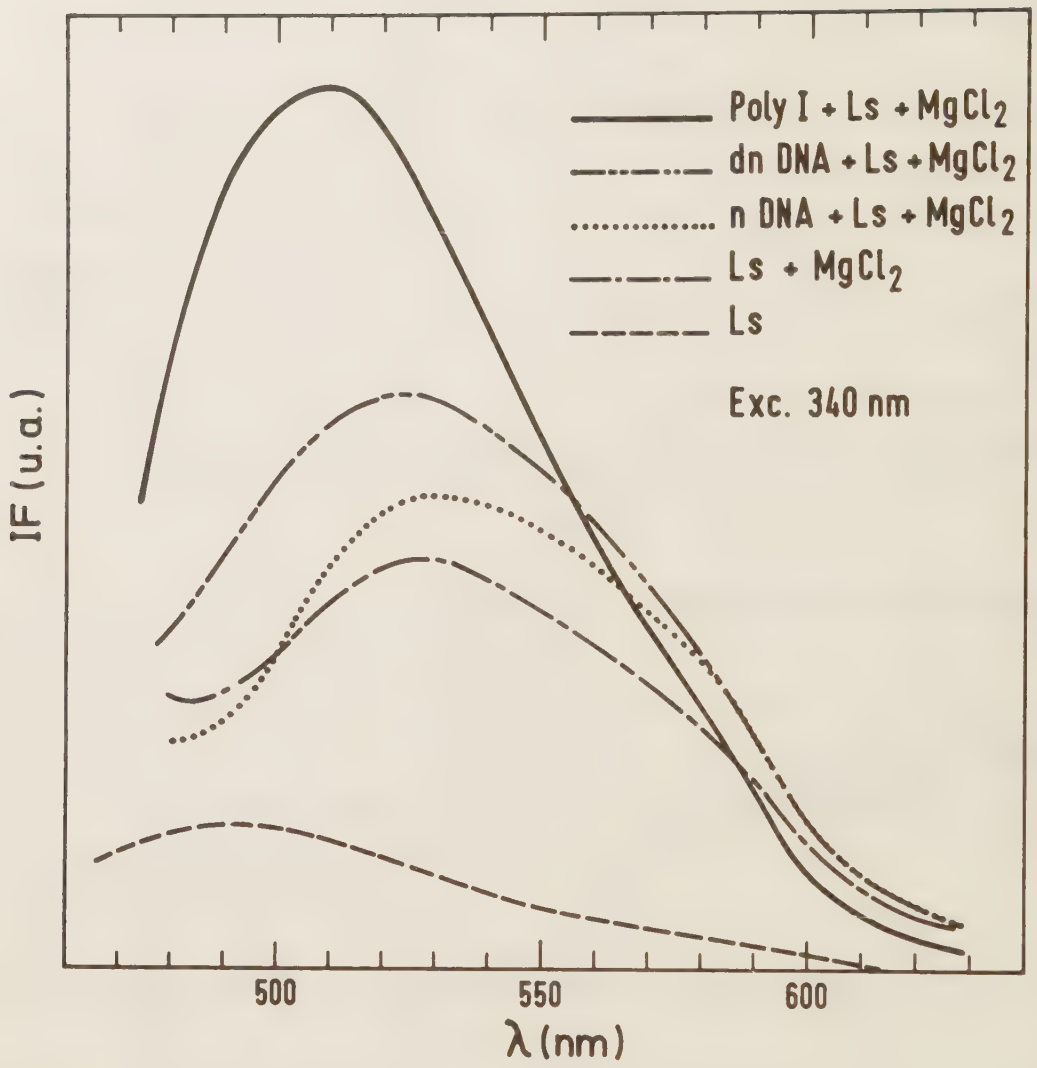


FIGURE 90 - SPECTRES D'EMISSION DE FLUORESCENCE des solutions dans le tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,4) du pigment (C_{Ls} = 0,020 mM) , du polychélate (Ls + $MgCl_2$, Mg/Ls = 4) du complexe II (avec l'ADN "natif" de thymus de veau, P/D ≃ 4), du mélange de complexes I et II (avec l'ADN dénaturé par la chaleur, P/D ≃ 6) et du complexe I (avec le Poly(I), P/D ≃ 4)

Pour être stable dans ces conditions, le complexe I nécessiterait la présence d'une certaine séquence de purines, ce qui est concevable dans le cas du complexe I avec l'ADN_1 par exemple. La nécessité d'une longueur minimum de la séquence des nucléotides puriques a été démontrée par l'étude des interactions de Ls avec les oligo(A) : les oligo(A) (longueur 1, 2, 3 ... 8 nucléotides) ont été séparés après hydrolyse alcaline ménagée du poly(A) par filtration sur gel Sephadex. La formation de complexe I n'a lieu que pour une longueur supérieure à 6 nucléotides, suggérant une structure stable pour des amas de trois pigments au minimum. La Ls et la Rg ne s'associent ni aux mono, ni aux dinucléotides (AMP, IMP, IpI), ni aux bases telles que l'adénine ou l'hypoxanthine : ce résultat est en accord avec le mode de stabilisation proposée ci-dessus.

D'autres causes de stabilisation peuvent encore exister :

- l'absence de formation de complexe I avec le diacétylrugulosine suggère que les $OH_{2\ 2'}$ de la rugulosine pourraient former, comme le montre le modèle moléculaire, une liaison hydrogène avec le N_7 proche de la purine voisine par exemple, (cf fig. 92 g),

- la stabilisation du complexe I provoquée par l'augmentation de la force ionique (NaCl) suggère que l'ion Na^+ pourrait stabiliser la structure "intercalée" du pigment entre les bases, par exemple. Une telle stabilisation proviendrait de la liaison éventuelle $N_3^- - Na^+ - CO_5^-$ et d'une diminution des forces répulsives électrostatiques entre pigments voisins.

- L'existence de "clusters" d'eau au voisinage des liaisons hydrophobes entre pigment intercalé et base purique, serait encore une cause de stabilisation (NEMETHY et SCHERAGA, 1962).

8) Discussion, Modèle du complexe I

La formation du complexe I résulte d'une <u>association non covalente</u> entre monomères (pigment + Mg) et acides nucléiques monocaténaires puriques. La non-covalence a été suggérée par de nombreux résultats expérimentaux dont ceux relatifs à la réversibilité de l'équilibre : $Ls_{libre} + AN_1 \overset{(Mg)}{\rightleftharpoons}$ complexe I en

fonction du pH et de la température, et ceux concernant la dissociation facile du complexe par l'EDTA.

L'association dans le complexe I doit mettre en jeu au moins deux liaisons :

a) La première liaison relie le groupe phosphate du polymère à la molécule de pigment par l'intermédiaire d'un cation divalent. La présence d'un ion divalent par pigment est indispensable à la formation du complexeI(résultat de stoéchiométrie)

- Le site de fixation de l'ion divalent sur le polymère est probablement le phosphate pour deux raisons : 1) les résultats RPE montrent que la distance minimale entre deux ions voisins M^{++} correspond à celle comprise entre deux phosphates ($\sim$ 6,4 Å) voisins , 2) les ions divalents alcalino-terreux comme le Mg^{2+} ont pour sites préférentiels les groupes PO_4^- (WYLUDA et al 1963, DAUNE et CHAMBRON 1968, IZATT et al 1971).

- Le site de fixation de l'ion sur le pigment serait la région anionique de la "cage" de la molécule, les $CO_{4-4'}^-$ de cette région étant les plus basiques. La fixation dans cette région est encore suggérée par les résultats de DCM, de l'action de la force ionique ainsi que de l'utilisation d'analogues.

b) La deuxième liaison résulte d'une interaction London-Van der Waals entre une moitié plane du pigment et une ou deux bases puriques voisines. Les arguments en faveur de ce mode de liaison sont les suivantes :

1) La présence de base purique est indispensable à la formation du complexe I, les complexes les plus stables obtenus étant le [poly(A)-Mg-Rg] et [poly(I)-Mg-Ls].

2) Il n'existe pas d'après l'expérience de méthylation du poly(A) et du poly(I) de sites de fixation sur les sommets N_1, NH_1, N_2, $(NH_2)_6$ ou $(CO)_6$ de la base purique, qui soient indispensables à la formation du complexe I. La liaison entre le pigment et la base purique pourrait se faire par exemple par insertion d'une partie (aromatique) du pigment entre les basiques puriques de l'acide nucléique monocaténaire.

3) L'hypothèse d'une intercalation partielle du pigment est encore confirmée par de nombreux résultats :

- L'analogie des spectres d'absorption et DC du complexe I et du pigment seul en solution dans un solvant organique (CCl_4, Acétone) suggère un environnement hydrophobe de la molécule de pigment engagé entre deux bases puriques. L'intercalation étant partielle (sur une moitié du pigment), l'intensité de la bande d'absorption du visible du complexe n'atteint pas la valeur de celle du pigment libre. L'augmentation de l'effet Cotton vers 430-450 nm traduit une augmentation d'asymétrie compatible avec l'insertion d'une partie du pigment entre les bases. L'analogie des spectres de fluorescence du complexe en solution aqueuse et du pigment en solution organique est également en accord avec les résultats d'absorption et de DC.

- L'augmentation de la stabilité thermique du poly(A) associé à la Ls ($T_M \simeq 80°C$) est compatible avec l'hypothèse d'une intercalation.

De telles modalités de fixation soulèvent deux remarques:

1) Il n'est pas nécessaire, pour qu'il y ait "intercalation" du pigment que le biopolymère soit en double hélice (DRUMMOND et al, 1965). La planéité du pigment et son accessibilité sont par contre des facteurs déterminants.

2) Dans le cas d'intercalation de la proflavine avec les polymères monobrins, il n'y a pas de spécificité vis à vis des bases purique ou pyrimidique (DOURLENT et HELENE, 1971).

La lutéoskyrine et la rugulosine ne sont en effet pas des molécules parfaitement planes. La présence de la "cage" centrale et notamment de l'$OH_{2\ 2'}$ en position axiale (KOBAYASHI et al, 1970) réduit la partie plane (de chaque moitié) au cycle aromatique. L'intercalation ne pourra donc se faire

1) que si elle est stabilisée par d'autres liaisons : l'absence de formation de complexe avec le pigment diacétylé en $O_{2,2'}$ suggère qu'une liaison hydrogène éventuelle relie un groupement OH_2 au groupe N_7 de la purine voisine par exemple ; l'augmentation

de stabilité du complexe I en présence d'un excès de Mg^{++} est également en faveur d'une liaison supplémentaire entre le CO_5^- du pigment et l'ion métallique fixé soit entre les bases (ROSENBERG et al, 1973), soit sur les N_3 des purines par exemple; 2) que s'il existe un couplage dipolaire important entre Ls et la base. Ce type de stabilisation dépend de la surface de recouvrement et de l'orientation des moments dipolaires des deux molécules superposées (PULLMAN, 1968). La construction du modèle moléculaire (CPK) montrant un recouvrement entre le pigment et la base, bien plus important dans le cas des purines que dans celui des pyrimidines, permet de comprendre la stabilité du complexe I avec les purines (Figures 92 c,d,e,et f).

Pourquoi n'observe-t'on pas alors de complexe I avec les acides nucléiques double brin? La comparaison des modèles moléculaires d'AN_2 et de pigments, compte tenu des résultats rapportés ci dessus relatifs aux sites de fixation en donne à notre avis une explication simple: La structure de la double hélice impose une distance trop grande entre les bases puriques et les groupes phosphates pour que puisse se former un complexe I stable. Ce dernier pourrait se former si les bases puriques pouvaient "sortir" ne serait-ce que partiellement de la double hélice,mais cette condition n'est pas encore suffisante, il faudrait faire "sortir" simultanément non pas une mais plusieurs bases puriques successives afin d'obtenir une fixation suffisamment coopérative. La stabilité du complexe I ainsi obtenu ne serait pas suffisante pour induire une déstabilisation aussi grande de la double hélice. En conclusion nous proposons un modèle de complexe I intercalé entre les bases puriques des AN_1 (schéma fig.91). Sur cette base nous avons construit différents modèles de complexes I comme Ls-Mg-Poly(I) et Ls-Mg-Poly(G). Nous reproduisons ci-après les photos du modèle CPK du complexe Ls-Mg-Poly(I),(Figures 92 a et suivantes).

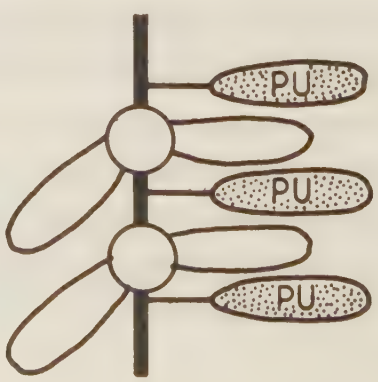


FIGURE 91: SCHEMA DU MODELE DE COMPLEXE I PROPOSE.

FIGURE 92 - PHOTO DU MODELE CPK DU COMPLEXE Ls-Mg-Poly(I).

a) - Vue de profil d'un segment comportant 2 molécules de pigment, liées chacune par un ion magnésium (cubes perforés) à la chaîne polyphosphate du biopolymère. Le segment photographié ne comporte que 4 bases hypoxanthine.

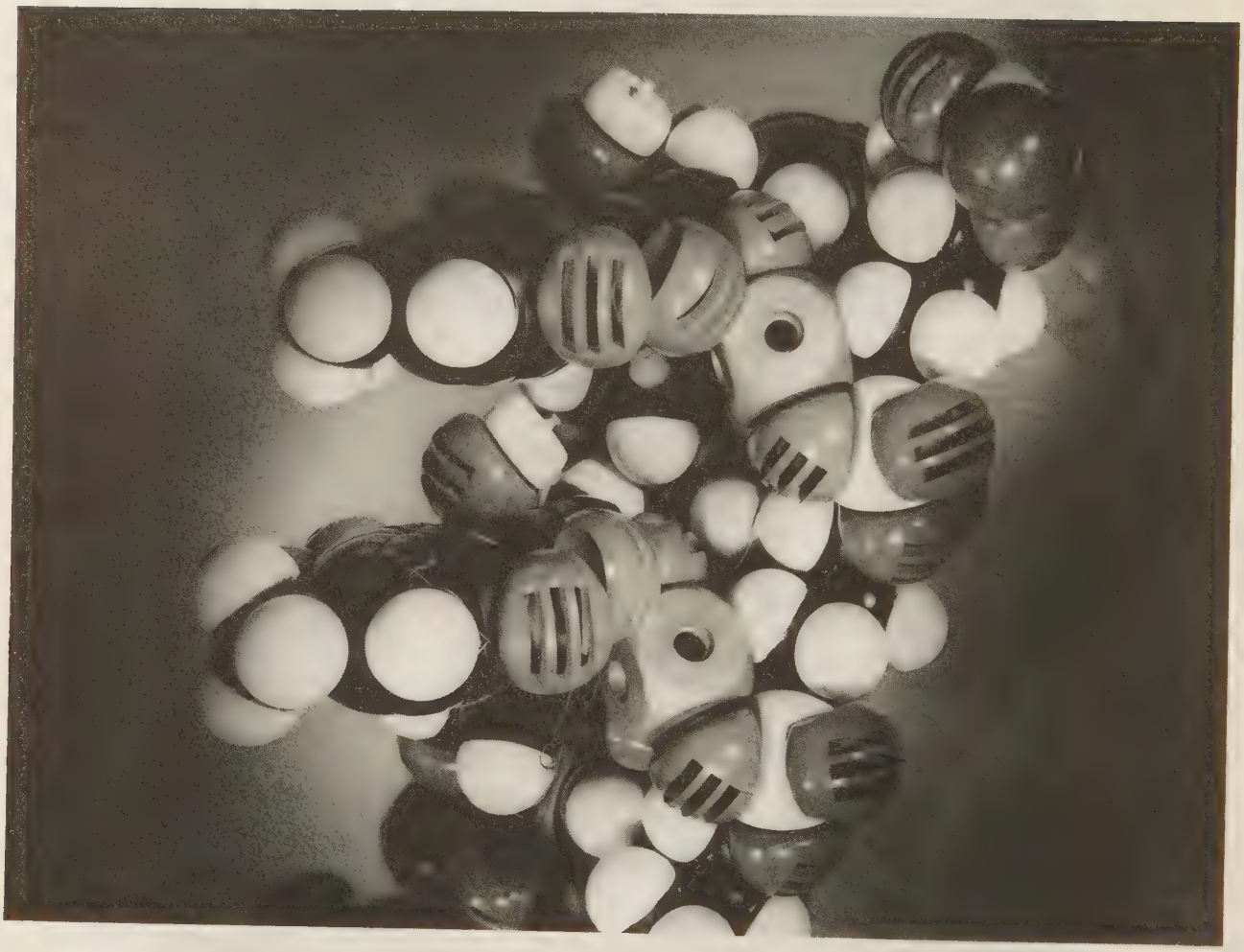


FIGURE 92 b) - COMPLEXE Ls-Mg-Poly(I).
Vue de profil montrant l'enchaînement des molécules du pigment par le Mg^{++} à la chaîne polyphosphate (liaison CO_4 - Mg - OP).

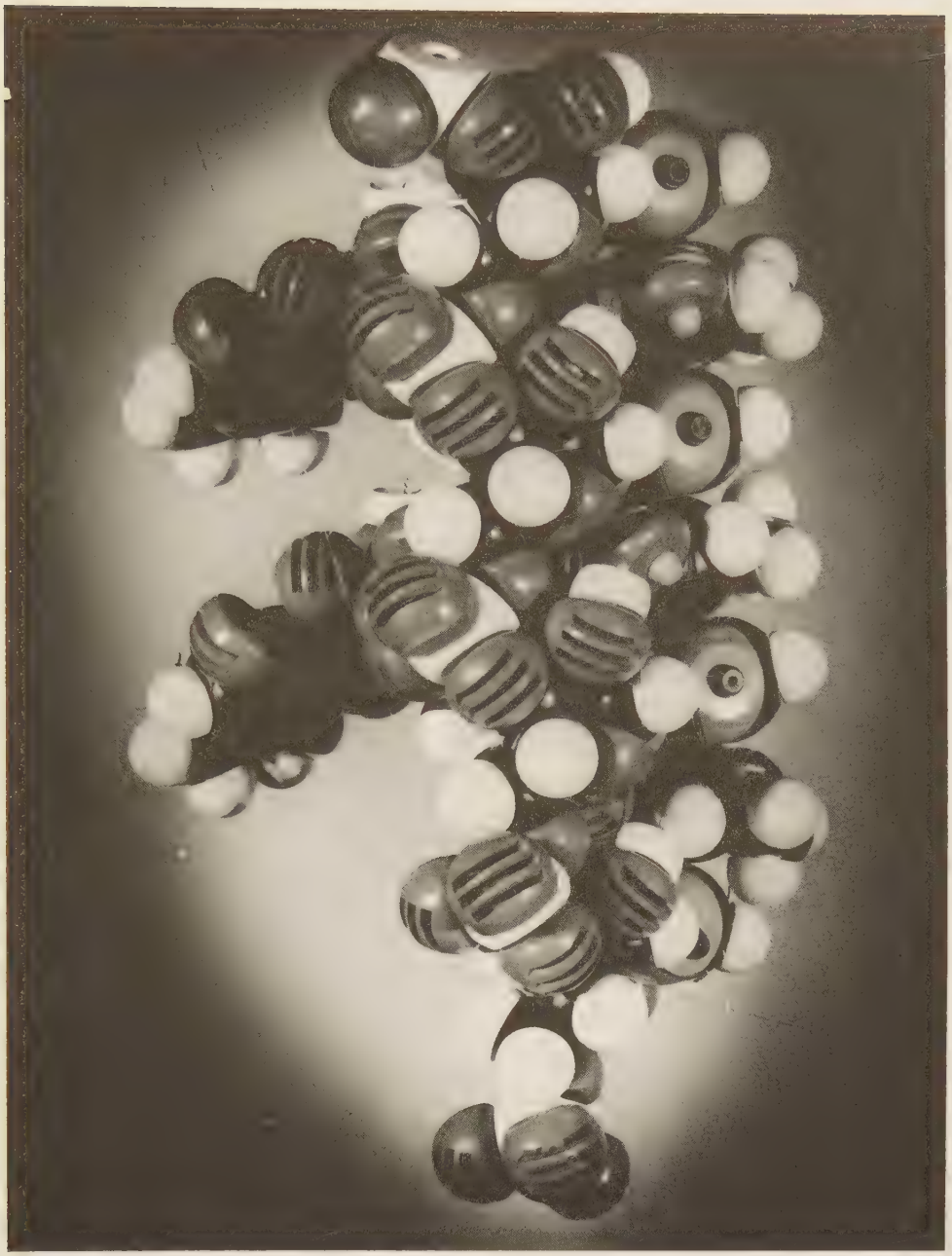


FIGURE 92 c) - COMPLEXE Ls-Mg-Poly(I).

Vue de profil montrant l'intercalation de l'un des chromophores de la molécule de pigment entre 2 bases puriques, l'autre chromophore étant à l'extérieur du polynucléotide. Noter la proximité des N_3 de l'hypoxanthine avec les CO_5^- du pigment.

FIGURE 92 d) - COMPLEXE Ls-Mg-Poly(I).

Vue externe de profil le long de la chaîne polyphosphate, montrant l'empilement compact - " Base purique-chromophore intercalé du pigment. On a inséré ici 3 molécules de pigment entre 4 bases hypoxanthine.

FIGURE 92 e) - COMPLEXE Ls-Mg-Poly(I).

Vue de dessus : L'hypoxanthine masque totalement l'un des chromophores du pigment sur lequel il est superposé.

FIGURE 92 f) - COMPLEXE Ls-Mg-Poly(I).
Vue montrant l'intercalation : Hypoxanthine-Ls et le recouvrement des cycles à 6 atomes respectifs de la base purique et du pigment.

FIGURE 92 g) - COMPLEXE Ls-Mg-Poly(I).
Vue montrant la stabilisation éventuelle par liaison H entre N_7 de la base et OH_2 (ou 2') du pigment.

CONCLUSION

L'existence de complexes I et II des pigments lutéoskyrine et rugulosine avec les acides nucléiques résulte de la conjonction de plusieurs facteurs :

1) Nécessité d'une charge positive conférée par la fixation d'un ion Mg^{2+} sur le pigment, permettant une liaison du pigment au groupe PO_4^- des acides nucléiques.

2) Existence de groupes anioniques (O^-) permettant la fixation de Mg^{2+}, aux pH physiologiques ($pK < 7$).

3) Présence d'une conformation quasi-plane (P-P), nécessaire à la polychélation (complexe II) et à l'intercalation (complexe I).

4) Présence d'une cage permettant l'ancrage des pigments aux AN_1 sous forme de complexe I spécifique.

Nous concluerons

1) en résumant les rôles respectifs du polychélate du complexe II et du complexe I au point de vue biologique,

2) en replaçant cette étude dans le cadre général des études des interactions entre petites et macromolécules et en soulignant que les modèles ont pu être proposés essentiellement sur la base de résultats expérimentaux,

3) en suggérant enfin 2 applications de l'utilisation de ces pigments.

1) Intérêt biologique

a - Polychélate et complexe II

L'existence d'un polychélate souligne l'importance d'une"polymérisation" ordonnée de certaines substances naturelles. La formation d'un polychélate précipitable en solution aqueuse diminuerait la toxicité du pigment en réduisant par exemple la quantité de complexe I formé par suite de la difficulté de pénétration au travers de la membrane (cas de Escherichia Coli).

Ainsi s'expliqueraient les différences observées entre les doses léthales ou toxiques selon le mode d'injection ou d'ingestion chez les mammifères. Par rapport à la dose administrée, la dose réellement incorporée activée sous forme de complexe I est très faible et fonction des diverses barrières à franchir.

Au niveau des AN_2 cependant, le rôle du complexe II assez stable ne doit pas être minimisé en raison des blocages pouvant intervenir du fait de la formation de réseaux de biopolymères (blocage des sites de reconnaissance des enzymes par exemple). Une fixation aspécifique, semblable à celle du complexe II, serait encore susceptible de se produire avec les protéines. La présence du complexe II dans les milieux biologiques pourrait encore inhiber certaines fonctions par colmatage des membranes cellulaires réduisant notamment la perméabilité cellulaire et entraînant la mort des cellules.

b - Complexe I

Du point de vue biologique il doit exister une relation étroite entre la spécificité des pigments pour les AN_1 et le rôle inhibiteur puissant de ces pigments vis à vis de la réparation, de la transcription et de la replication. En élevant la concentration saline (Na, Mg) du milieu biologique étudié (soit *in vitro* soit *in vivo*) on diminue la formation du complexe II et l'on doit encore renforcer l'activité biologique du pigment sous forme de complexe I.

2) Intérêt formel de ce type d'étude dans le cadre des interactions entre petites et grosses molécules.

Le modèle du complexe II proposé est celui d'une fixation partielle sur l'acide nucléique d'un agrégat ordonné (polychélate hélicoïdal) de pigment reliant plusieurs molécules d'ADN entre elles (réseau). Un tel modèle, comparable à celui d'une "polymérisation tangentielle" proposé par STRYER et BLOUT (1959) n'avait encore jamais été prouvé expérimentalement. Le modèle du complexe I entre Ls ou Rg et les AN_1 rappelle celui d'une "intercalation partielle" proposé par PRITCHARD (1966) pour les acridines.

Pour des raisons stériques et de stabilité, ce type de complexe n'existe qu'en présence d'acides nucléiques monocaténaires (ADN ou ARN) comportant des bases puriques, et constitue un modèle de fixation spécifique.

Les complexes I et II qui possèdent des spectres DC bien caractérisés pourraient servir d'exemple pour l'étude de l'activité optique des complexes entre petites et macromolécules. Le problème posé par ce genre d'étude est en effet celui de la contribution à l'activité optique des interactions entre pigments (plus proches voisins) et des interactions entre pigment et environnement asymétrique (BLAKE et PEACOCKE 1965, GARDNER et MASON 1967, YAMAOKA et RESNIK 1967, LI et CROTHERS 1969 b, DALGLEISH et al 1971, LEE et al 1973) .

3) Perspectives d'études avec Ls et Rg.

La spécificité du complexe I suggère l'utilisation de Ls ou de préférence Rg (la cinétique de formation de Rg-Mg étant plus lente que celle de Ls-Mg d'une part, le polychélate de Ls étant plus sensible à l'effet de la force ionique d'autre part) en milieu salin (0,1 à 1 M) pour "doser" les séquences des purines des acides nucléiques monocaténaires et pour titrer éventuellement ces séquences sur les doubles brins partiellement dénaturés. La lutéoskyrine pourrait également être utilisée pour doser le magnésium dans les solutions biologiques diluées (10^{-4} à 10^{-6} M).

REFERENCES

ARMSTRONG J.L. (1969)
Applied Polymer Symposia, 8, 17

ARNOTT S. (1970)
Progr. Biophys., 21, 265

ARNOTT S., CHANDRASEKARAN R. et MARTILA C.M. (1974)
Biochem. J., (sous presse)

ARNOTT S., HUKINS D.W.L. (1973)
J. Mol. Biol., 81, 93

ARNOTT S., HUKINS D.W.L., DOVER S.D., FULLER W. et HODGSON A.R. (1973)
J. Mol. Biol., 81, 107

ARNOTT S., WILKINS M.H.F., FULLER W. et LANGRIDGE R. (1967)
J. Mol. Biol., 27, 525 et 535

BABA H. et SUZUKI S. (1961)
J. Chem. Phys., 35, 1118

BATES R.G. (1954)
Electrometric pH determinations, p. 127, J. Wiley and Son (N.Y.)

BATES R.G., PAABO M. et ROBINSON R.A. (1963)
J. Phys. Chem., 67, 1833

BAUER W. et VINOGRAD J. (1968)
J. Mol. Biol., 33, 141

BAYLISS N.S. et McRAE E.G. (1954)
J. Phys. Chem. 58, 1002, 1006

BECK M.T. (1970)
Chemistry of complex equilibria p. 212 et 229
Van Nostrand Reinhold C° London.

BIRKINSHAW J.H. (1955)
Biochem. J., 59, 485

BLAKE A. et PEACOCKE A.R. (1966)
Biopolymers, 4, 1091

BLOOM H., BRIGGS L.H. et CLEVERLY B. (1959)
J. Chem. Soc., 178

BOUHET J.C., PHAM VAN C.P. et FROMAGEOT P. (1974 a, b)
En préparation

BRADLEY D.F. et WOLF M.K. (1959)
Proc. Nat. Acad. Sci., 45, 944

BRAM S. (1971 a)
J. Mol. Biol., 58, 277

BRAM S. (1971 b)
Nature N.B., 232, 174

BRAM S. (1971 c)
Nature N.B., 233, 161

BRAHMS J. (1963)
J. Am. Chem. Soc., 85, 3298

BRAHMS J., MICHELSON A.M. et VAN HOLDE K.E. (1966)
J. Mol. Biol., 15, 467

BRAHMS J. et SADRON C. (1966)
Nature, 212, 1306

BREALEY C.J. et KASHA M. (1955)
J. Am. Chem. Soc., 77, 4462

BREEN J., DACRE J.C., RAISTRICK H. et SMITH G. (1955)
Biochem. J., 60, 618

BRIAT B. et DJERASSI C. (1968)
Nature, 217, 918

BRIAT B., SCHOOLEY D.A., RECORDS R., BUNNENBERG E. et DJERASSI C. (1967)
J. Am. Chem. Soc., 89, 6170

BUCKINGHAM A.D. et STEPHENS P.J. (1966)
Ann. Rev. Phys. Chem., 17, 399

BURAWOY A. (1941)
J. Chem. Soc., 20

BUTLER W.H. et BARNES J.M. (1966)
Nature, 209, 90

BUTZOW J.J. et EICHORN G.L. (1965)
Biopolymers, 3, 95

CALDWELL D., THORNE J.M. et EYRING H. (1971)
Ann. Rev. Phys. Chem., 22, 259

CHAMPETIER G. et MONNERIE G. (1969)
Introduction à la chimie macromoléculaire, p. 609
Masson et Cie, Ed.

CHAMBRON J., DAUNE M. et SADRON C. (1966)
Biochim. Biophys. Acta, 123, 306, 319

CHANTOT J.F. (1973)
Thèse de doctorat d'état - Paris (Orsay)

CHANTOT J.F., HAERTLER T. et GUSCHLBAUER W. (1974)
Biochimie. (sous presse)

CHARLOT G. (1966)
Les méthodes de la chimie analytique pp. 21, 490, 657
Masson et Cie, Ed.

CLEMENT R.M., STURM J. et DAUNE M. (1973)
Biopolymers, 12, 405

COTTON F.A., BISHOP J.J., EISS R. et HUGEL R.P. (1967)
Nature, 214, 1111

COURTOIS Y., GUSCHLBAUER W. et FROMAGEOT P. (1968)
European J. Biochem., 6, 106

CRAWFORD L.V. et WARING M.J. (1967)
J. Mol. Biol., 25, 23

DAHAN F. (1974)
Acta Cristallog., B30, 22

DALGLEISH D.G., PEACOCKE A.R., FEY G. et HARVEY C. (1971)
Biopolymers, 10, 1853

DARLOW S. (1959)
Hydrogen Bonding, p. 37 (HADZI J.D., Ed.). Pergamon Press (N.Y)

DAUNE M. (1969)
Biopolymers, 7 , 659

DAUNE M. (1970)
Studia Biophys., Berlin, 24125, 287

DAUNE M. et CHAMBRON J. (1968)
J. Chim. Phys., 65, 72

DAVIES R.V. (1950)
J. Appl. Chem., 9, 368

DAVIES D.R. et RICH A. (1958)
J. Am. Chem. Soc., 80, 1003

DEARMAN H.H. (1973)
J. Chem. Phys., 58, 2135

DE LIGNY C.L., LUYKX P.F.M., REHBACH M. et WIENEKE A.A (1960)
Recueil, 79, 699 et 713

DICKENS F., JONES H.E.H., WAYNFORTH H.B. (1966)
Brit. J. Cancer , 20, 134

DJERASSI C. (1960)
Optical Rotatory Dispersion, p. 164, McGraw Hill Cº.

DJERASSI C., BUNNENBERG E. et ELDER D. (1971)
Pure Appl. Chem., 25, 57

DOPPLER-BERNARDI F. et DAUNE M. (1969)
Biopolymers, 7, 671

DOTY P. , McGILL B. et RICE S. (1958)
Proc. Natl. Acad. Sci., 44, 432

DOURLENT M. et HELENE C. (1971)
Eur. J. Biochem., 23, 86

DREIDING A. (1959)
Helv. Chim. Acta, 42, 1339

DROTT H.R. et DEARMAN H.H. (1967)
J. Chem. Phys., 47, 1896

DRUMMOND D.S., SIMPSON-GILDEMEISTER V.F.W et PEACOCKE A. (1965)
Biopolymers, 3, 135

DUMAS J.M., COHEN A. et GOMEL M. (1972)
Bull. Soc. Chim. France, 4, 1340

DYER J.R. (1970)
Spectroscopie d'absorption appliquée aux composés organiques, p. 92, DUNOD - PARIS

EDSALL J.T. et WYMAN J. (1958)
Biophysical Chemistry, p. 182, Acad. Press.

EICHORN G.L. et SHIN Y.A. (1968)
J. Am. Chem. Soc., 90, 7323

EISENBERG H. et FELSENFELD G. (1967)
J. Mol. Biol., 30, 17

EMSLEY J.W., FEENEY J. et SUTCLIFFE L.H. (1965)
High Resolution NMR Spectroscopy, Vol.2 , 817,
Pergamon Press, Oxford.

ENOMOTO M. et SAITO M. (1972)
Annual Review of Microbiology - vol. 26, p. 1597
Ann. Reviews Inc., Palo Alto, U.S.A

FASMAN G.D., LINDBLOW C. et GROSSMAN L. (1964)
Biochemistry, 3, 1015

FELSENFELD G. et HUANG S. (1959)
Biochim. Biophys. Acta, 34, 234

FELSENFELD G. et HUANG S. (1960)
Biochim. Biophys. Acta, 37, 425

FESTY B. (1971)
Thèse de Doctorat es-sciences, Université de Strasbourg, France.

FESTY B., POISSON Y. et PAOLETTI C. (1971)
FEBS Letters, 17, 321

FINK K. et ADAMS W.S. (1966)
J. Chromato., 22, 118

FLETT M.S.C. (1948)
J. Chem. Soc., 1441

FOSS J.G. et McCARVILLE M.E. (1966)
J. Chem. Phys., 44, 4350

FOSS J.G. et McCARVILLE M.E. (1967)
J. Am. Chem. Soc., 89, 30

FRENKEL J. (1931)
Phys. Rev., 37, 17

FRESCO J.R. et MASSOULIE (1963)
J. Am. Chem. Soc., 85, 1352

FREYMANN R. et SOUTIF M. (1960)
La spectroscopie hertzienne appliquée à la chimie
p. 184 et 210 - DUNOD - PARIS

FRIEDMAN P.A., JOEL P.B. et GOLBERG I.H. (1969)
Biochemistry, 8, 1535

FRIEDMAN P.A., TING KAI LI et GOLBERG I.H. (1969)
Biochemistry, 8, 1545

FULLER W. et WARING M.J. (1964)
Ber. Bunsenges. Physik. Chem., 68, 805

FULLER W. , WILKINS M.H.F., WILSON H.R., HAMILTON L.D. et ARNOTT S. (1965)
Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A., 45, 482

GABORIAUD R. (1966)
C.R. Acad. Sc. Paris, 263 C, 911

GARDNER B.J. et MASON S.F. (1967)
Biopolymers, 5, 79

GELSEMA W.J., DE LIGNY C.L. et VISSERMAN G.F. (1965)
Recueil, 84, 1129

GENET F., GUERCHAIS Y.E., PHAM VAN CHUONG P., BOUHET J.C., et FROMAGEOT P. (1969)
FEBS Letters, 2, 181

GUSCHLBAUER W. et VETTERL V. (1969)
FEBS Letters, 4, 57

HADZI' D. et SHEPPARD N. (1954)
Trans. Faraday Soc., 50, 911

HAMAGUCHI K. et GEIDUSCHEK E.P. (1962)
J. Am. Chem. Soc., 84, 1329

HAMILTON L., FULLER W. et REICH E. (1963)
Nature (London), 198, 538

HARTMANN H. et LORENTZ E. (1952)
Z. Naturforsch., 7a, 360

HARVEY A.E. (1950)
J. Am. Chem. Soc., 72, 4488

HELMKAMP G.K. et TS'O P.O.P. (1962)
Biochim. Biophys. Acta, 55, 601

HERMANS P.H. (1949)
Gels in Colloid Science, Tome 2, p. 483
H.R. Kruyt, Ed., Elsevier

HOLLEBONE B.R., MASON S.F. et THOMPSON A.J. (1969)
Symp. Faraday Soc., 3, 146

HOWARD B.H. et RAISTRICK H. (1954)
Biochem. J., 57, 212

ICHIMURA S., ZAMA M., FUJITA H. et ITO T. (1969)
Biochim. Biophys. Acta, 190, 116

INOUE H., HOSHI T., YOSHINO J. et TANIZAKI Y. (1972)
Bull. Chem. Soc. Japan, 45, 1018

IRVING H. et ROSSOTTI H.S. (1956)
Acta Chem. Scand., 10, 72

IZATT R.M., CHRISTENSEN J.J. et RYTTING J.H. (1971)
Chemical Review, 5, 445

JAFFE H.H. et ORCHIN M. (1966)
Theory and Applications of UV spectroscopy p. 187
Wiley, N.Y.

JANIK B. (1971)
Physico chemical characteristics of Oligonucleotides and Polynucleotides. IFI/Plenum. N.Y.

JENSEN R.H. et DAVIDSON N. (1966)
Biopolymers, 4, 17

JOSIEN M.L. et FUSON N. (1952)
Bull. Soc. Chim. France, 389

KASHA M. (1950)
Faraday Soc. Disc., 9, 14

KASHA M., EL-BAYOUMI A.M. et RHODES W. (1961)
J. Chim. Phys., 58, 916

KERSTEN W. et KERSTEN H. (1968)
Molecular Associations in Biology, p. 289
Ed. PULLMAN B. , Acad. Press. New York and London

KIRZENBAUM M., LEICKNAM J.P., PHAM VAN CHUONG P., BOUHET J.C. et FROMAGEOT P.
En préparation

KOBAYASHI N., ITAKA Y. et SHIBATA S. (1970)
Acta Crystallog., 326, 188

KORSHAK V.V., VINOGRADOVA S.V. et ARTEMOUA V.S. (1960)
Vysokomolekuyarnye Soedininiya, 2(4), 492

KOSOWER E.M. (1958)
J. Am. Chem. Soc., 80, 3253 et 3261

KUHN W. (1930)
Trans. Faraday Soc., 46, 293

KUBOYAMA A. (1958)
Bull. Chem. Soc. Japan, 31, 752

KUBOYAMA A. et WADA K. (1966)
Bull. Chem. Soc. Japan, 39, 1874

KUBOYAMA A. et YABE S. (1967)
Bull. Chem. Soc. Japan, 40, 2475

LABHART H. (1957)
Helv. Chim. Acta, 40, 1410

LABHART H. (1961)
Chimia, 15, 20

LABHART H. et WAGNIERE G. (1959)
Helv. Chim. Acta, 42, 2219

LANCASTER M.C., JENKINS F.P. et PHILIP J.M. (1961)
Nature, 192, 1095

LANGRIDGE R., WILSON H.R., HOOPER C.W., WILKINS M.H.F., et HAMILTON L.D. (1960)
J. Mol. Biol., 2, 19

LEE C.H., CHANG C.T. et WETMUR J.G. (1973)
Biopolymers, 12, 1099

LEIBOVICI C. et DESCHAMPS J. (1966)
Theoret. Chim. Acta, 4, 321

LE PECQ J.B. (1971)
Methods of Biochemical Analysis, 20, 41
Ed. GLICK D., Interscience Publ.

LE PECQ J.B. et PAOLETTI C. (1967)
J. Mol. Biol., 27, 87

LENG M. et FELSENFELD G. (1966)
J. Mol. Biol., 15, 455

LERMAN L.S. (1963)
Proc. Natl. Acad. Sci., 49, 94

LERMAN L.S. (1964)
J. Cell. Comp. Physiol., 64, suppl. 1, 1

LEWIS et RANDALL (1961)
Thermodynamics, McGraw Hill Ed.

LI N.Y. et CROTHERS D.M. (1969a)
J. Mol. Biol., 39, 461

LI H.Y. et CROTHERS D.M. (1969b)
Biopolymers, 8, 217

LOW W. (1960)
Paramagnetic Resonance in Solids

LOWRY T.M. et FRENCH H.S. (1932)
J. Chem. Soc., 2654

LUCK G. et ZIMMER C. (1972)
Eur. J. Biochem., 29, 528

MASON S.F. (1961)
Quat. Rev., 45, 287

MASSOULIE J. (1968)
Europ. J. Biochim., 3, 428-438

Mc CARVILLE M.E. (1967)
Ph. D. Thesis, IOWA State Univ. p. 35, 79 et 105

Mc CONNELL H. (1952)
J. Chem. Phys., 20, 700

Mc CONNELL B. et VON HIPPEL P.H. (1970)
J. Mol. Biol., 50, 297 et 317

Mc RAE E.G. (1956)
J. Phys. Chem., 61, 562

MICHELSON A.M. et GRUNBERG-MANAGO M (1964)
Biochim. Biophys. Acta 91, 92

MICHELSON A.M., MASSOULIE J. et GUSCHLBAUER W. (1967)
Prog. in Nucleic Acid Res. and Molec. Biology. 6, 83

MICHELSON A.M. et POCHON F. (1966)
Biochim. Biophys. Acta 114, 469

MICHELSON A.M. et POCHON F. (1968)
Biochim. Biophys. Acta 174, 604

MILES H.T. et FRAZIER J. (1964)
Biochim. Biophys. Acta 79, 216

MILMAN G., CHAMBERLAIN M. et LANGRIDGE R. (1967)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 1804

MIYAKE M., SAITO M., ENOMOTO M., TAKASHI K., SHIMADA H. et ITAKURA H. (1964)
Nippon Byorigaku Kaishi 53, 124

MOFFIT W. et MOSCOWITZ A. (1959)
J. Chem. Phys. 30, 648

MOORE R.E. et SCHEUER P.Y. (1966)
J. Org. Chem. 31, 3272

MOORE W.J. (1961)
"chimie physique" p. 106 H. ABERDAM, DUNOD-

MORTON R.A. et EARLAN W.T. (1941)
J. Chem. Soc., 159

MOSCOWITZ A. (1967)
Proc. Roy. Soc., A297, 16

MOUTON R.F. et FROMAGEOT P. (1971)
FEBS Letters 15, 45

MÜLLER W. et CROTHERS D.M.
J. Mol. Biol., 35, 251 (1968)

MULLIKEN R.S. (1955)
J. Chem. Phys., 23, 1997

MUSSO H. et SEEGER I. (1960)
Chem. Ber., 93, 796

NAGEL G.M. et HANLON S. (1972)
Biochemistry, 11, 816

NAYAK R., SIRSI M. et PODDER S.K. (1973)
FEBS Letters, 30, 157

NEMETHY G. et SCHERAGA H.A. (1962)
J. Chem. Phys., 36, 3382

OHBA Y. (1966)
Biochim. Biophys. Acta, 123, 84-90

OHBA Y. et FROMAGEOT P. (1967)
Europ. J. Biochem., 1, 147-51

OHBA Y. et FROMAGEOT P. (1968)
Europ. J. Biochem., 6, 98 - 105

OSAKI K. , NAKAI Y. et WATANABE T. (1964)
J. Phys. Soc. Japan 19 (5), 717

PAKE G.E. (1962)
Paramagnetic Resonance p. 89
W.A. Benjamin, Inc. (N.Y)

PANNETIER G. et SOUCHAY P. (1964)
Cinétique chimique p. 8, p. 123, Masson

PERNOLLET J.C. (1974)
Thèse 3ème cycle - Paris Sud (ORSAY)

PETERS R.H. et SUMNER H.H. (1953)
J. Chem. Soc., 2101

PHAM VAN CHUONG P. (1968)
Diplôme d'étude Approfondie, Paris Sud (ORSAY)

PHAM VAN CHUONG P., BOUHET J.C., THIERY J. et FROMAGEOT P. (1973)
Tetrahedron, 29, 3533

PHAM VAN CHUONG P., BOUHET J.C., SCHNEIDER C.R.L. et FROMAGEOT P. (1974)
J. Chim. Phys. (sous presse)

PHAM VAN CHUONG P., SARTENE R.M., BOUHET J.C. et FROMAGEOT P.
en préparation

PIMENTEL G.C. , et Mc CLELLAN A.L. (1960)
The hydrogen Bond p. 80
Reinhold Publi. Corp. (N.Y.)

PLATEL A., UENO Y. et FROMAGEOT P. (1968)
Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 678

PLATONA N.V., POPOV K.P. et SMIRNOV L.V. (1969)
Opt. i Spektr., 26, 357

POCHON F. et MICHELSON A.M. (1965)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 53, 1425

POPOV K.P. (1958)
Opt. i Spektr., 4, 404

POPOV K.P. et SMIRNOV L.V. (1962)
Opt. i Spektr., 13, 280

PRITCHARD N.J. , BLAKE A. et PEACOCKE A.R. (1966)
Nature (London) 212, 1260

PULLMAN B. (1968)
Molecular Associations in Biology, p. 14
Acad. Press (N.Y - London)

REICH E. et GOLBERG I.H. (1964)
Progr. Nucleic Acid Res., 3, 183

REICHARDT C. (1971)
Effets de solvant en chimie organique p. 37
Flammarion, Sciences, France.

REVET B.N.J., SCHMIR M. et VINOGRAD J. (1971)
Nature N.B., 229, 10

RHODES W. (1961)
J. Am. Chem. Soc., 83, 3609

RICHARDS E.G., FLESSEL C.P. et FRESCO J.R. (1963)
Biopolymers, 1, 431

RIDDICK J.A. et BUNGER W.B. (1970)
Organic solvent techniques of chemistry, vol. 2
Wiley Intersciences (N.Y)

ROSENBERG J.M., SEEMAN N.C., KIM J.J.P., SUDDATH F.L., NICHOLAS H.B. et RICH A. (1973)
Nature N.B., 243, 150

ROSE Y. (1971)
Les complexes moléculaires, p. 88 - Dunod, Paris.

RUET A., SENTENAC A., SIMON E., BOUHET J.C. et FROMAGEOT P. (1973)
Biochemistry, 12, 2318

SAITO M. (1959)
Acta Pathol. Japon ; 9, 785

SAITO M., ENOMOTO M. et TATSUNO T. (1971)
Microbial Toxins, vol. 6, p. 299 - Acad. Press (N.Y and London)

SARGEANT K., SHERIDAN A., O'KELLY J., CARNAGHAN R.B.A (1961)
Nature, 192, 1096

SARKAR P.K. et YANG J.T. (1965)
Biochemistry, 4, 1238

SCATCHARD G. (1949)
Ann. N.Y. Acad. Sci., 51, 660

SCHACHTSCHABEL D.O., ZILLIKEN F., SAITO M. et FOLEY G.E. (1969)
Exp. Cell. Res., 57, 19

SCHATZ P.N. et Mc CAFFERY A.J. (1969)
Quat. Rev., 23, 552

SCHLÄFER M.L. et SCHAFFERNICHT W. (1960)
Angew. Chem., 72, 618

SCHUBERT W.M. et CRAVEN Y.M. (1960)
J. Am. Chem. Soc., 82, 1357

SCHWARTZ G., KLOSE S., et BALTHASAR W. (1970)
Eur. J. Biochem., 12, 442, 454 et 461

SCOTT A.I. (1964)
Interpretation of the UV spectra of natural products
p. 104, 125 et 290 - Pergamon Press, Oxford

SCOTT J.D. et WATSON W.H. (1968)
J. Chem. Phys., 49, 4246

SEAMANS L. et MOSCOWITZ A. (1972)
J. Chem. Phys., 56, 1099

SENTENAC A., RUET A., et FROMAGEOT P. (1967)
Bull. Soc. Chim. Biol., 49, 247

SHIBATA S., MURAKAMI T. et TAKIDO M. (1956a)
Pharm. Bull. (Tokyo), 4, 303

SHIBATA S. et KITAGAWA I. (1956b)
Pharm. Bull. (Tokyo), 4, 309

SHIBATA S., OGIHARA Y., KOBAYASHI N. et KITAGAWA I. (1968)
Tetrahedron Letters, 53, 5557

SIDMAN J.W. (1956)
J. Am. Chem. Soc., 78, 4567

SIDMAN J.W. (1957)
J. Chem. Phys., 27, 820

SOBELL H.M. (1972)
Jerusalem Symp. Quant. Chem. and biochem., vol 4, 149

SOUCHAY P. et LEFEBVRE J. (1969)
Equilibres et réactivité des complexes en solution
p. 261 - MASSON

SPRUIT C.J.P. (1949)
Recueil, 68, 309 et 325

STEINER R.F. et BEERS R.F. (1961)
Polynucléotides, Elsevier Ed., Amsterdam

STEPHENS P.J. (1970)
J. Chem. Phys., 52, 3489

STEPHENS P.J., SCHATZ P.N., RITCHIE A.B. et Mc CAFFERY A.J. (1968)
J. Chem. Phys., 48, 132

STRYER L. et BLOUT E.R. (1961)
J. Am. Chem. Soc., 83, 1411

SUEMITSU R. (1963)
Agr. Biol. Chem., 27, 1

TAMARI K. (1952)
Nipp. Nogei Kagaku Kaishi, 26, 223

TCHOUBAR B. (1964)
Bull. Soc. Chim., 2069

THIERR J.C., DOURLENT M. et LENG M. (1971)
J. Mol. Biol., 58, 815

THIELE D. et GUSCHLBAUER W. (1973)
Biophysik, 9, 261

TICHY M. (1965)
Adv. Org. Chem., 5, 115

TINOCO I.,Jr. (1960)
J. Am. Chem. Soc., 82, 4785

TINOCO I.,Jr. (1961)
J. Am. Chem. Soc., 83, 5047

TINOCO I.,Jr. (1963)
Radiation Research, 20, 133

TINOCO I.,Jr. et BUSH C.A. (1964)
Biopolymers Symposia, 1, 235

TINOCO I.,Jr., WOODY R.W., BRADLEY D.F. (1963)
J. Chem. Phys., 38, 1317

TOLLIN G. (1968)
Biochemistry, 7, 1720

TOMA F., PHAM VAN CHUONG P., BOUHET J.C. et FROMAGEOT P. (a, b)
(En préparation)

TONNELAT J. (1968)
Biophysique, Vol. 1, p. 255 - MASSON

TONNELAT J. (1973)
Biophysique, Vol. 2, p. 29 - MASSON

UENO Y., PLATEL A. et FROMAGEOT P. (1967)
Biochim. Biophys. Acta, 134, 27

UENO I., TOKITA K., LITOI Y., UENO Y., et URAGUCHI K., (1969)
Nipp. Yakur. Zasshi, 65, 74

UENO Y., UENO I., SATO N. , LITOI Y., SATO M., ENOMOTO M. et TSUNODA H. (1971)
Jap. J. Exp. Med., 41, 177

UMEDA M. (1964)
Acta Pathol. Japon, 14, 373

UMEDA M. et SAITO M. (1968)
Proc. 27th Ann. Meeting Japan. Cancer Assoc., Tokyo, p.97

URAGUCHI K. (1965)
"Proc. 23rd Intern. Congr. Physiol. Sci. Tokyo"
Intern. Congr. Ser., 87, 465

URAGUCHI K., TATSUNO T., SAKAI F., TSUKIOKA M., SAKAI Y., YONEMITSU O., ITO H., MIYAKE M., SAITO M., ENOMOTO M., SHIKATA T. et ISHIKO T. (1961)
Japan. J. Exptl. Med., 31, 19

VAN HOLDE K.E., BRAHMS J. et MICHELSON A.M. (1965)
J. Mol. Biol., 12, 726

VAN UITERT L.G., HAAS G., FERNELIUS W.C. et DOUGLAS B.E. (1953)
J. Am. Chem. Soc., 75, 455

VAN VLECK J.H. (1948)
Phys. Rev., 74, 1158

VETTERL V. et GUSCHLBAUER W. (1972)
Arch. Biochem. Biophys., 148, 130

VINOGRADOV N. et LINNEL R.H. (1971)
Hydrogen Bonding, p. 57
Van Nostrand Reinhold Co (N.Y.)

VOISIN D., HUOT A. et GASTAMBIDE (1968)
Ann. Chim., 3, 497

VOELTER W., BARTH G., RECORDS R., BUNNENBERG E. et DJERASSI C. (1969)
J. Am. Chem. Soc., 91, 6165

WALSH W.M., RUPP Jr. L.W. et WYLUDA B.J. (1963)
Proc. First Intern. Conf. Paramag. Res., 2, 836

WARD D.C. , REICH E. and GOLBERG I.H. (1965)
Science, 149, 1259

WARING M.J. (1970)
J. Mol. Biol., 54, 247

WARSHAW M.M., BUSH C.A. et TINOCO I. Jr. (1965)
Biochim. Biophys. Res. Com., 18, 633

WILSON H.R. (1973)
Jerusalem Symposium Quant. Chem. and Biochem., vol.5, 261

WITZ J. et LUZZATI V. (1965)
J. Mol. Biol., 11, 620

WYLUDA B.J., EISINGER J. et SHULMAN R.G. (1963)
Bull. An . Phys. Soc., 8, 199

YAMAOKA K. et RESNIK R. (1967)
Nature, 213, 1031

YOSHIDA Z. et TAKABAYASHI F. (1968)
Tetrahedron, 24, 913

ZOMPA L.J. et BOGUCKI R.F. (1966)
J. Am. Chem. Soc., 88, 5186